

00581 (2)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA FLEXIBILIDAD EN EL MOTIVO  
ASA/ $\beta$ B'/HÉLICE 5/ASA/ $\beta$ C' (158-187) EN LA  
REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA GLUCOSAMINA-6-  
FOSFATO DESAMINASA DE *Escherichia coli*.

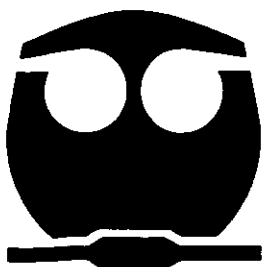
# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

M. EN B. ISMAEL BUSTOS JAIMES

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO L. CALCAGNO



MÉXICO D.F.

298350

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES

VOCAL: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO

VOCAL: DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

VOCAL: DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA

SECRETARIO: DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SUPLENTE: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

SUPLENTE: DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN

**SUSTENTANTE**

M. en B. ISMAEL BUSTOS JAIMES

**TUTOR**

MARIO L. CALCAGNO

**COMITÉ TUTORIAL**

DR. ANDRÉS HERNÁNDEZ ARANA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

DR. MARIO L. CALCAGNO

## TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

El trabajo experimental fue realizado en los Laboratorios 6 y de Físicoquímica y Diseño de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con la asesoría del Dr. Mario L. Calcagno.

Este proyecto contó con los siguientes apoyos:

- Beca para estudios doctorales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (88411).
- Complemento de beca doctoral de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA, UNAM.
- Donativo de DGAPA-PAPIIT, UNAM.
- Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, PAEP.

*A mi madre*

## **Agradecimientos**

A Mario L. Calcagno, quien se encargó de hacer de este trabajo una situación divertida y de quien he aprendido mucho.

A todos mis amigos del Laboratorio 6 y después del Laboratorio de Físicoquímica y Diseño de Proteínas, que después se convirtió en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas: como seguramente se me va a escapar algún nombre, mejor ni lo intento... de cualquier modo ustedes saben a quiénes me refiero. También a los amigos del Departamento de Bioquímica de la facultad de Medicina de la UNAM, con quienes pasé algunos buenos momentos.

A los miembros de mi comité tutorial, Andrés y Rogelio, por sus consejos y comentarios.

A los miembros del Jurado, por sus correcciones, sugerencias y atinados comentarios.

A la Facultad de Química y a la UNAM, por mi formación.

# ÍNDICE

Contenido	Pág.
Resumen.	2
Summary.	3
Antecedentes	4
Importancia de la flexibilidad en el funcionamiento de las enzimas.	4
Generalidades del modelo de estudio: la glucosamina-6-fosfato desaminasa.	5
El motivo asa/ $\beta$ B'/hélice5/asa/ $\beta$ C' (158-187).	9
Hipótesis	12
Objetivos.	13
Resultados.	14
1- Estudio termodinámico de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> .	14
2- Sobre el papel de la movilidad de la tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> .	20
3- Estudio de la movilidad de la tapa del sitio activo asociada a la transición alostérica en la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> .	48
Metodología.	49
Resultados y discusión.	50
Conclusiones.	60
Conclusiones generales.	61
Perspectivas.	62
Referencias.	64

## RESUMEN

La enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (EC 3.5.99.6) de *Escherichia coli* es una enzima alostérica activada por *N*-acetilglucosamina-6-fosfato. Participa en el catabolismo de aminoazúcares y está ampliamente distribuida entre bacterias y mamíferos. Esta enzima cataliza la desaminación e isomerización de la glucosamina-6-fosfato para producir fructosa-6-fosfato y amonio. La estructura cristalográfica de esta proteína sugiere la existencia de un cambio de movilidad conformacional, en lugar de un cambio geométrico de cuerpo rígido, asociado a la transición alostérica. Uno de los principales puntos de interés es la tapa del sitio activo (segmento 158-187) que cambia drásticamente sus factores B cristalográficos entre los estados alostéricos T y R. El estudio termodinámico de la transición alostérica nos ha dado información sobre la importancia de los componentes entálpico y entrópico de dicho proceso, evidenciando que es un proceso dirigido entrópicamente. Esto sugiere que existe un cambio de flexibilidad asociado a la transición cuaternaria. La movilidad de la tapa del sitio activo se probó mediante mutagénesis sitio-específica, alterando la movilidad de este motivo. El comportamiento cinético y estructural de esta mutante ha evidenciado la importancia de la movilidad de la tapa del sitio activo en la unión de sustrato, el proceso catalítico y en la comunicación entre los sitios activo y alostérico. Finalmente, el estudio de los cambios de flexibilidad del motivo 158-187 vistos a través de la fluorescencia en estado estacionario de triptofanos, tanto de los residuos naturales como de residuos colocados por mutagénesis en la tapa del sitio activo, demostraron que el cambio cuaternario no está asociado directamente con la movilidad de la tapa y que, el cambio en la movilidad de este motivo puede alterar las interacciones estructurales del resto de la enzima.



## SUMMARY

Glucosamine-6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6) from *Escherichia coli* is an allosteric enzyme activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate. This enzyme participates in the pathway for utilisation of amino sugars and is widespread among bacteria and mammals. The enzyme catalyses the deamination and isomerisation of glucosamine-6-phosphate to fructose-6-phosphate and ammonia. The crystallographic structure of this protein strongly suggests the existence of a conformational-mobility shift, instead of a rigid-body geometrical change, associated to the allosteric transition for this enzyme. The most dramatic change occurs in the motif that covers the active site, the active-site lid (segment 158-187). This motif reduces its crystallographic B factors during the T to R transition. The thermodynamic study of the allosteric transition in terms of the entropic and enthalpic components of the process, has shown that the allosteric transition for this enzyme is driven by entropy, suggesting that a flexibility change is associated to the allosteric transition. The role of flexibility in the active-site lid was approached perturbing the mobility of this motif by site-directed mutagenesis. The kinetic and structural behaviour of a mutant in which the lid mobility has been perturbed demonstrated the critical role of the active-site lid mobility in substrate binding, in the catalytic process, and in the communication between the active and the allosteric sites. Finally, flexibility changes of the segment 158-185 were studied with steady state Trp fluorescence of the naturally occurring Trp residues and a mutant containing a single Trp residue in the active-site lid. The fluorescence study shows that the quaternary change of the enzyme is not associated to the active-site lid mobility and that the perturbation of this lid can disturb the interactions in the remainder of the enzyme.

## ANTECEDENTES

### *Importancia de la flexibilidad en el funcionamiento de las enzimas*

Los procesos dinámicos son parte de la función catalítica de todas las enzimas. Esta dinámica está implicada en eventos como la unión de sustratos o cofactores, la liberación de productos y los cambios alostéricos. El propio proceso catalítico requiere de una flexibilidad inherente ya que las posiciones de los átomos, del sitio activo, del sustrato, de los intermediarios y del producto, cambian conforme avanza el proceso catalítico. Existe abundante evidencia experimental y teórica sobre la naturaleza flexible de muchas enzimas. Sin embargo, poco sabemos de cómo esta flexibilidad está acoplada a los procesos catalíticos (Osborne y col., 2001). Se sabe que el estado nativo de una enzima es en realidad un conjunto estadístico de estados conformacionales cuyas energías libres son equivalentes. La facilidad de cruzar entre un estado y otro dependerá de la flexibilidad de la proteína o bien de las interacciones de ésta con un ligando específico. Esto quiere decir que las proteínas pueden existir como entidades con un cierto grado de desestructuración y que adquieren una estructura más definida cuando se unen a un ligando (Huang y col., 2001). La propagación de estos cambios estructurales está dada por interacciones cooperativas, que son el puente que une el comportamiento de distintos aminoácidos dentro de una molécula de proteína. Como resultado de estas interacciones, las perturbaciones físicas o químicas en cualquier residuo se propagan por toda la molécula. De este modo, los aminoácidos perciben los efectos de perturbaciones que ocurren en lugares lejanos de la molécula proteica (Hilser y col., 1998).

Para llevar a cabo la catálisis, las enzimas frecuentemente modifican su conformación estructural, incluyendo cambios en asas superficiales que poseen importancia funcional. Estas asas pueden adoptar conformaciones “abiertas”, que permiten la entrada de sustrato y la liberación de producto del sitio catalítico, y conformaciones “cerradas”, que aíslan al sustrato del disolvente y facilitan las interacciones enzima-sustrato que hacen posible la catálisis. Las enzimas, en las reacciones químicas catalizadas, proveen a los reactivos un ambiente estructural y electrónico preorganizado para ser complementario con los estados de transición del sustrato. Es

posible que los movimientos de la proteína estén acoplados a la formación de estructuras muy similares a los estados de transición y, en consecuencia, eleven la probabilidad de que ocurra la reacción (Osborne y col., 2001).

Existen muchos ejemplos en la literatura científica moderna de la importancia de la flexibilidad de ciertos motivos de las proteínas en la catálisis. La tioesterasa/proteasa I de *E. coli* tiene una estructura central de hojas  $\beta$  y hélices  $\alpha$  que son esencialmente rígidas, mientras que el sitio de unión de sustrato es, por el contrario, bastante flexible; esta flexibilidad está asociada a la necesidad del sitio de interactuar con el sustrato (Huang y col., 2001). En el caso de la ribocinasa de *E. coli*, existen cambios conformacionales que están asociados a su función catalítica. La unión de la ribosa al sitio activo produce un cambio conformacional en el que una hoja  $\beta$  de cuatro cadenas actúa como una “tapa”, cerrándose sobre el sustrato y produciendo un cambio cuaternario que permite a la enzima el reconocimiento y unión del cosustrato, ATP (Sigrell y col., 1999).

Finalmente, es necesario señalar que los estudios cristalográficos proveen mucha información sobre la estructura de las proteínas, al grado de declarar que la estructura que nos presentan es esencialmente la misma que encontramos en disolución (Fersht, 1999). Sin embargo, es claro que los estudios cristalográficos no pueden realizarse sino en un rango estrecho de condiciones experimentales. Más aún, el proceso de cristalización selecciona normalmente sólo a una familia de conformeros muy parecidos estructuralmente de una posible gran variedad que existe en disolución (Nelson y col., 2000). Es por ello que los estudios fisicoquímicos son necesarios para tener un panorama más preciso de la naturaleza de la función enzimática.

### ***Generalidades del modelo de estudio: la glucosamina-6-fosfato desaminasa***

La enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6 antes EC 5.3.1.10) cataliza la isomerización y desaminación reversible de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) e ion amonio (Comb y Roseman, 1958; Midelfort y Rose, 1977, Calcagno y col., 1984). Esta enzima fue descrita

inicialmente en *Neurospora* y riñón porcino por Leloir y Cardini (1956) y ha sido identificada en diversas especies de animales, protozoarios, hongos y bacterias. Las GlcN6P desaminasas de *E. coli* (Altamirano y col. 1991), *Candida albicans* (Nataranjan y Datta, 1993), de riñón canino (Lara-Lemus, y col., 1993) y riñón bovino (Lara-Lemus y Calcagno, 1998), así como de espermatozoides de *Metacricetus auratus* (Parrington y col., 1996) han sido purificadas. A esta lista hay que agregar la desaminasa humana recombinante, expresada y purificada en nuestro laboratorio (no publicado). Se conocen también los genes de las GlcN6P desaminasas hipotéticas de *Caenorhabditis elegans*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi* y un segundo gen en humano y en ratón, ligeramente más cortos que el primero, cuyas secuencias se encuentran depositadas en el *Gene Bank*. Excepto las enzimas renales de mamíferos, en todos los demás casos se dispone del gen correspondiente y se obtienen de cepas recombinantes que las expresan.

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es una enzima alostérica activada por *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Esta enzima cataliza un paso en el catabolismo de aminoazúcares que permite a *E. coli* la utilización de glucosamina (GlcN) y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) como fuentes de carbono. Los aminoazúcares también son componentes de los lipopolisacáridos y del proteoglicano de la pared celular de *E. coli*. En ausencia de aminoazúcares, la GlcN6P se forma a partir de Fru6P y L-glutamina por la enzima GlcN6P sintasa. Las enzimas participantes en estas reacciones catabólicas y anabólicas están perfectamente reguladas a nivel de la expresión de los genes correspondientes (Plumbridge y col., 1993). Las proteínas que participan en el transporte y la utilización de GlcNAc en *E. coli* se encuentran en los operones divergentes *nagE* y *nag BACD* (Plumbridge, 1989). Estos genes se expresan al crecer la bacteria en GlcN o GlcNAc como única fuente de carbono. La inducción depende de la GlcNAc6P, que se une al producto del gen *nagC*, que es una proteína represora. La GlcNAc6P, el coinductor del regulón, es también el activador alostérico de la GlcN6P desaminasa, que es el producto del gen *nagB*. Debido a sus propiedades alostéricas, la GlcN6P desaminasa juega un papel central en la regulación de la síntesis y degradación de aminoazúcares en *E. coli* (Plumbridge, 1989, Altamirano y col, 1995).

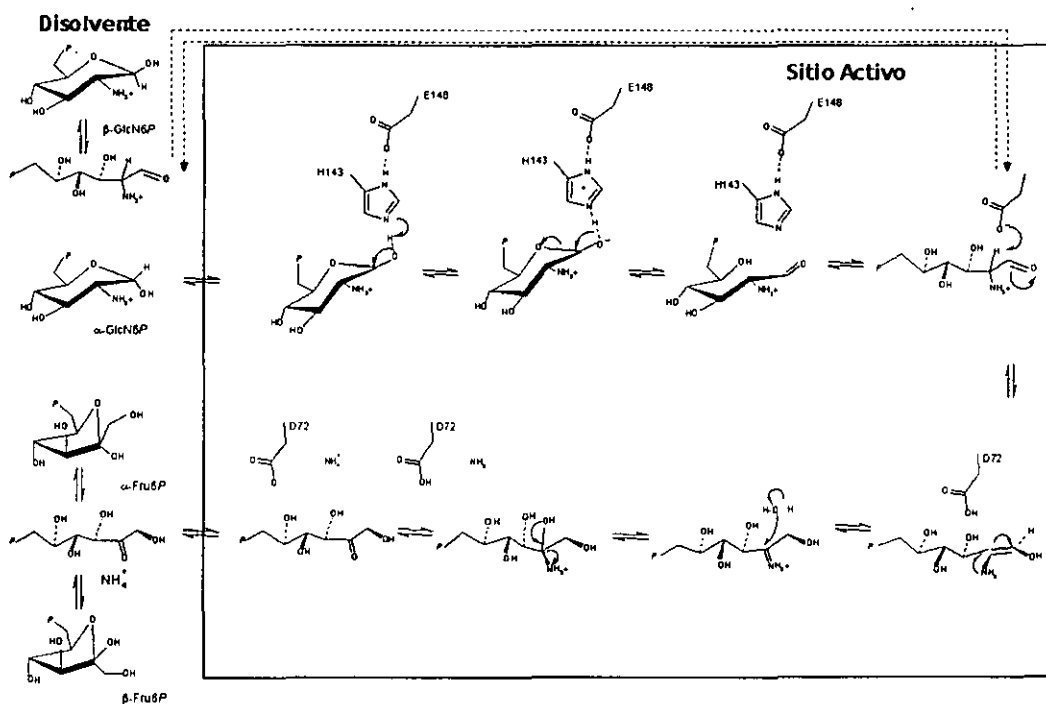
La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es un hexámero de unidades idénticas de 266 aminoácidos (29.7 kDa) cuya secuencia se obtuvo a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *nagB* (Rogers y col., 1988). Una búsqueda sistemática de homología con otras proteínas, no se reveló semejanza significativa con otras enzimas, excepto con las GlcN6P desaminasas de otras especies y el gen hipotético de la galactosamina 6-P desaminasa de *E. coli* (Reizer y col. 1996). La enzima de *E. coli* es de lejos la más estudiada hasta el momento y la mejor conocida de todas las GlcN6P desaminasas. La enzima se obtiene de una cepa sobreproductora (Altamirano y col., 1991) y sus características cinéticas han sido estudiadas en detalle. Esta enzima presenta cooperatividad homotrópica con respecto a sus sustratos, GlcN6P en la reacción de desaminación y Fru6P en el sentido biosintético.

La cinética alostérica de esta enzima puede describirse con mucha precisión por el modelo de Monod, Wyman y Changeux (Modelo de MWC, Monod y col., 1966) de unión no exclusiva para el caso del sustrato y unión exclusiva para el activador, GlcNAc6P. Este activador alostérico tiene el efecto de aumentar la afinidad aparente de la enzima por la GlcN6P (o la Fru6P en el sentido inverso), lo que se acompaña de la pérdida de la cooperatividad homotrópica. A concentraciones saturantes de GlcNAc6P, la GlcN6P desaminasa presenta una cinética hiperbólica. Este comportamiento es característico de los llamados sistemas *K* (Monod y col., 1966). En un sistema *K* la activación, ya sea homotrópica o heterotrópica, cambia la afinidad de la enzima por el sustrato sin que se modifique la  $k_{cat}$ , o sea la  $V_{max}$  de la reacción. La presencia del efector es suficiente para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato y a su vez el sustrato modifica la afinidad de la enzima por el efector (Monod, 1965). Esto ocurre sin que se vea modificada la constante catalítica de la enzima, es decir,  $k_{cat}$  se mantiene constante en ambos estados alostéricos, R y T (Altamirano y col., 1995).

El 1995 se publicó la estructura de la forma R de la enzima de *E. coli*, a partir de datos cristalográficos de difracción de rayos X a una resolución de 2.1 Å. Se resolvieron los complejos enzima-Pi (fosfato inorgánico ocupando los sitios activo y alostérico), enzima-GlcNAc6P y enzima- 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-P (GlcN-ol-6P). Este último ligando es un inhibidor sin salida, que ocupa el sitio activo (Oliva y col.,

1995). La topología del monómero es semejante a un dominio de unión de NAD modificado por la adición de tres segmentos: a) la región N-terminal hasta el residuo 35 ; b) el extremo C-terminal (residuos 243-266) y c) un segmento que va del residuo 141 al 188 y que constituye una inserción que contiene la tapa del sitio activo. Esta última es el punto de interés central de este proyecto. El hexámero puede considerarse como un dímero de trímeros, con una simetría interna 32 (Oliva y col., 1995). Los sitios alostéricos se encuentran en los espacios entre las subunidades que forman los trímeros. De este modo, los sitios de unión del activador alostérico se encuentran formados por dos subunidades vecinas. Este hecho hace notar que se establecen contactos importantes entre subunidades al unirse el ligando. Más recientemente se obtuvo el modelo de la forma T a 2.2 Å de resolución, en ausencia de ligandos (Horjales y col., 1999). La estructura de la forma R y sus complejos muestran inequívocamente los sitios alostérico y activo de la enzima y su comparación con la forma T demuestra el cambio global que experimenta la proteína en la transición alostérica.

Midelfort y Rose (1977) propusieron un mecanismo catalítico basado en el mecanismo general de las isomerasas cetoaldólicas (Rose, 1975). Con base a la estructura del complejo enzima-GlcN-ol-6P se propuso un mecanismo catalítico (Oliva y col., 1995) que ha sido completado con datos cinéticos en el que se puntualiza la importancia de los residuos del sitio catalítico, His143 y Glu148 en la apertura del anillo del sustrato (Montero-Morán y col., 2001). La GlcN-ol-6P, que es un análogo del estado de transición de la reacción de isomerización-desaminación, es un potente inhibidor de la desaminasa. Este mecanismo (Figura 1) comienza con la apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P por el residuo His143. En este punto, el carboxilato del residuo de Asp72 sustrae el protón de C2 y, de manera concertada, se lleva a cabo la enolización entre C1 y C2 del aminoazúcar (*cis*-enol-amonio). El protón del residuo 72 se transfiere al átomo de oxígeno del carbonilo en C1. Posteriormente, el *cis*-enol-amonio isomeriza a la oxima correspondiente (fructosimina 6-P), la que a su vez reacciona con una molécula de agua. El producto de este paso pierde el protón del átomo de oxígeno en C2 (hacia el carboxilato de Asp72), esto lo hace sumamente inestable, y mediante un mecanismo concertado, el alcóxido formado oxida a C2 para formar un carbonilo cetónico y liberar amoniaco.

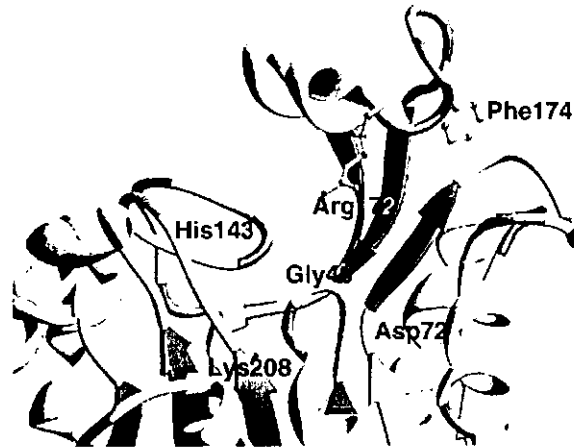


**Figura 1. Mecanismo de reacción propuesto para la enzima GlcN6P desaminasa. Las líneas punteadas corresponden al equilibrio de unión de la forma aldehído del sustrato (tomado de Montero-Morán y col., 2001).**

### *El motivo asa/ $\beta$ B'/hélice5/asa/ $\beta$ C' (158-187)*

El sitio activo en las proteínas con el plegamiento en barril  $\alpha/\beta$  sigue un patrón característico y está separado del disolvente por dos o más asas del borde C-terminal del barril  $\beta$ . En las estructuras  $\alpha/\beta$  abiertas no existe un patrón tan uniforme en la estructura de la “tapa” del sitio activo. Sin embargo la ubicación de esta tapa puede predecirse en la mayoría de los casos (Brandén y Tooze, 1991). La GlcN6P desaminasa cumple esta regla general (Oliva y col., 1995). En el caso de nuestra enzima, el motivo que separa el hueco del sitio activo del medio acuoso, la “tapa” (Figura 2), es una inserción que altera la topología típica de un dominio de unión a NAD (un doble plegamiento de Rossman). Oliva y col. (1995) muestran cómo la desaminasa tiene un plegamiento basado en esta estructura, conteniendo tres

modificaciones importantes. Una de ellas es el motivo asa/ $\beta$ B'/héllice5/asa/ $\beta$ C' (158-187), que contiene a la tapa del sitio activo. Esto es característico del plegamiento de esta enzima, lo que ha valido figurar como un subtipo nuevo (*deaminase fold*) en la clasificación SCOP (Murzin y col., 1995).



**Figura 2.** La tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Se muestran las cadenas laterales de los residuos Phe174 y Arg172 y se señalan otros que son importantes en la catálisis.

La tapa contiene la cadena  $\beta$  158-161 que contiene dos residuos ligantes del fosfato alostérico (Arg158, Lys160) y del grupo acetilo de la GlcNAc6P (Thr161), un asa o giro 162-164, seguida de una hélice compleja, 164-174. Se trata de una hélice  $\alpha$  que en 170 se transforma en hélice  $3_{10}$ , hasta 174 (una vuelta y media de hélice  $3_{10}$ ). El segmento  $3_{10}$  contiene un residuo del sitio activo, Arg172 que une el grupo fosfato del sustrato. Al final de la hélice aparece el residuo Phe174, cuya cadena lateral se proyecta hacia una región hidrofóbica de la enzima y constituye un evidente punto de anclaje de este motivo. Estas consideraciones derivan del análisis del modelo estructural de la forma R de la enzima, para la preparación de este proyecto. Las interacciones de este motivo que forma una tapa del sitio activo siguieren que no es sólo un dispositivo para aislar el complejo enzima-sustrato del disolvente acuoso, sino que puede desempeñar un papel clave en la conexión del sitio activo con el sitio alostérico. Esto apunta a que este motivo puede recibir y transmitir hacia el sitio activo señales que se generan cuando el activador alostérico, la GlcNAc6P, se une a su sitio



específico, en el hueco entre subunidades vecinas alrededor del eje de orden tres de la molécula. A su vez, las señales derivadas del ajuste inducido en el sitio activo ocupado pueden alcanzar al sitio alostérico a través del motivo 158-187.

El contacto entre las subunidades mediado por el CO de la cadena principal en Thr161, sólo existe en la conformación alostérica R (en T, el OH de Tyr254 hace contacto con el CO de la cadena principal del residuo Pro149). Se ha propuesto que este desplazamiento de los contactos del residuo Tyr254 funciona como una llave de dos posiciones, que controla la afinidad variable del sitio activo, alta en R y baja en T (Montero-Morán y col., 1998).

En resumen, el motivo 158-187 participa en las siguientes funciones de la enzima:

1. Unión de ligandos al sitio alostérico (fosfato inorgánico, GlcNAc6P).
2. Contactos entre subunidades, cambiantes con la transición alostérica (que se manifiesta a nivel de la estructura cuaternaria como el giro de 11 grados sobre el eje de orden 3, de un trímero sobre otro) la que modifica los contactos de Tyr254, y que contacta con el motivo de la tapa sólo en la forma R.
3. Unión de sustrato y sus análogos (Arg172).

El motivo de la tapa está anclado transitoriamente en la forma R con el sitio activo ocupado por la cadena lateral de Arg172 y el fosfato del ligando, al resto de los grupos ligantes del fosfato del sitio activo (Lys208, grupos CO de cadena principal en 43-44, OH de Thr de 41). Por otra parte, está anclada en forma permanente a una región hidrofóbica en el centro de la molécula, a través de la cadena lateral de Phe174. Éste es un punto particularmente interesante para crear una desaminasa con una tapa menos fija.

Los cambios conformacionales del motivo que forma de la tapa pueden ser la causa de cambios en la afinidad en el sitio activo. El residuo Arg172 está en el punto en que se articula la hélice  $\alpha$  con un corto segmento de hélice  $3_{10}$ . Este segmento es particularmente tenso en la hélice en su conjunto por la presencia de ese segmento de hélice  $3_{10}$ , lo cual lo convierte en una región de posibles cambios de flexibilidad.

## **HIPÓTESIS**

Los cambios de flexibilidad de la tapa del sitio activo (motivo 158-187) deben estar sumamente relacionados con la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. En consecuencia la alteración de la flexibilidad de este motivo debe afectar el comportamiento alostérico de la enzima.

## OBJETIVOS

Evaluar los componentes entálpico y entrópico de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Este estudio termodinámico nos dará información sobre las componentes que gobiernan el cambio de energía de Gibbs asociada a la transición alostérica. Estos componentes nos darán indicios sobre la importancia de los cambios de flexibilidad asociados al cambio cuaternario.

Modificar la flexibilidad o movilidad de la tapa del sitio activo por técnicas de ingeniería de proteínas. A través del comportamiento cinético y estructural de esta mutante (Phe174Ala) podremos entender mejor el papel de la flexibilidad tanto en la catálisis como en la transición alostérica.

Estudiar la movilidad de la tapa del sitio activo asociada a la transición alostérica. Este estudio podrá aportar información no sólo sobre el cambio cuaternario sino también del ajuste conformacional causado por la unión de ligados al sitio activo y la función del mismo en la conexión entre el sitio activo y el alostérico en la enzima silvestre, o en mutantes *ad hoc* para las que se haya demostrado su validez como modelos experimentales.

## RESULTADOS

### **1- Estudio termodinámico de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli***

La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* ha sido estudiada termodinámicamente, encontrándose que es un proceso dirigido entrópicamente, al igual que la unión de GlcN6P al sitio activo. El estudio, dentro del marco del modelo MCW, demuestra que la adición secuencial de moléculas de sustrato en el sitio activo disminuye la barrera energética que existe entre los estados alostéricos T y R.

## Allosteric Transition and Substrate Binding Are Entropy-Driven in Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from *Escherichia coli*

Ismael Bustos-Jaimes<sup>1</sup> and Mario L. Calcagno

Laboratorio de Físicoquímica y Diseño de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-159, Ciudad Universitaria, 04510, Mexico City D.F., Mexico

Received May 25, 2001, and in revised form July 3, 2001; published online September 20, 2001

Glucosamine-6P-deaminase (EC 3.5.99.6, formerly glucosamine-6-phosphate isomerase, EC 5.3.1.10) from *Escherichia coli* is an attractive experimental model for the study of allosteric transitions because it is both kinetically and structurally well-known, and follows rapid equilibrium random kinetics, so that the kinetic  $K_m$  values are true thermodynamic equilibrium constants. The enzyme is a typical allosteric  $K$ -system activated by *N*-acetylglucosamine 6-*P* and displays an allosteric behavior that can be well described by the Monod-Wyman-Changeux model. This thermodynamic study based on the temperature dependence of allosteric parameters derived from this model shows that substrate binding and allosteric transition are both entropy-driven processes in *E. coli* GlcN6P deaminase. The analysis of this result in the light of the crystallographic structure of the enzyme implicates the active-site lid as the structural motif that could contribute significantly to this entropic component of the allosteric transition because of the remarkable change in its crystallographic B factors. © 2001

Academic Press

**Key Words:** glucosamine-6-phosphate deaminase; allosteric transition; thermodynamic properties; active-site lid.

Classical descriptions of allosteric systems imply the existence of equilibria between discrete conformational states of the protein. Although a more recent view of the possible conformations available for a native protein in solution implies a more complex picture, it is possible to derive models for allosteric systems on the

basis of a few states. Usually two states are considered although they actually represent equilibria between distinct populations of conformational states sharing similar binding or catalytic properties and located at either side of a significant free-energy barrier (1). The Monod-Wyman-Changeux (MWC)<sup>2</sup> allosteric model (2) postulates that allosteric transitions occur in an all-or-none fashion (concerted transition) always maintaining the molecular symmetry. This model accounts for both the sigmoidal substrate-binding curves, (substrate positive homotropic cooperativity) as well as the heterotropic effects caused by the binding of specific effectors to allosteric sites. The model assumes the existence of only two conformational states in equilibrium, which are defined as *R* (relaxed) and *T* (tense) conformations. Since the resolution of the structures of the *T* and *R* states of hemoglobin, the paradigm of allosteric proteins, X-ray crystallography has revealed the structure of these extreme conformations for most allosteric enzymes (3, 4).

The MWC model introduces two kinetic parameters, *L* and *c*, to describe cooperativity. They are defined, respectively, as the equilibrium constant relating these two conformational states in the absence of ligands ( $L = [T_0]/[R_0]$ ) and the ratio of the affinity constants of the *T* and *R* states of the protein for a specific ligand ( $c = K_R/K_T$ ). The latter constant can be related to a differential Gibbs energy that Wyman called free energy of subunit interaction (5),  $\Delta G'_w$ . This constant is indeed a measure of the change of the active-site affinity for the substrate, produced by the allosteric transi-

<sup>2</sup> Abbreviations used: MWC model, Monod, Wyman, and Changeux model;  $K_R$  and  $K_T$ , the  $K_m$  values for the *R* and *T* states, respectively; GlcN6P, D-glucosamine 6-phosphate; GlcNAc6P, *N*-acetyl-D-glucosamine 6-phosphate; Fru6P, D-Fructose 6-phosphate.

<sup>1</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: +52 56162419. E-mail: [ismaelb@servidor.unam.mx](mailto:ismaelb@servidor.unam.mx).

tion and not a true measure of the Gibbs energy of subunit interaction.

Its  $\Delta G'_w$  is related to the allosteric constant  $c$  by the expression  $\Delta G'_w = RT \ln c$ . The symbol  $G'$  refers to the conventionally defined standard state, except for  $[H^+]$ , which was set to  $3.16 \times 10^{-8}$  M (pH 7.5). According to this definition, it corresponds to the  $\Delta G^\circ$  for the equilibrium  $R + TS \rightleftharpoons RS + T$ .

The power of the MWC model resides in its ability to describe cooperativity with only two experimental parameters. The study of the temperature dependence of  $c$  and  $L$  is a potential source of valuable information on allosteric proteins. However, such kinds of thermodynamic studies have been rarely carried out in detail (6–8). Glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6P deaminase, EC 3.5.99.6, formerly classified as glucosamine 6-phosphate isomerase, EC 5.3.1.10) from *Escherichia coli* is an attractive experimental model for the thermodynamic study of allosteric transitions because it has been extensively characterized both kinetically and structurally (9–11, 13, 14). It catalyzes the isomerization and subsequent deamination of glucosamine 6-phosphate (GlcN6P), forming fructose 6-phosphate (Fru6P), and ammonia. It displays rapid equilibrium random kinetics; that implies that  $K_m$  values are true equilibrium constants. Allosteric regulation of *E. coli* GlcN6P deaminase is the result of a change in its apparent affinity for ligands that occurs without any change in the catalytic constant,  $k_{cat}$  (pure  $K$ -system) (2). This deaminase is allosterically activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P), which is an exclusive-binding ligand, that is, it binds only to the  $R$  form (10, 11). This means that under hyperbolic kinetics obtained at a saturating concentration of GlcNAc6P, the  $K_m$  value for GlcN6P is equal to the microscopic dissociation constant for this substrate for the  $R$  state of the enzyme, i.e.,  $K_m^{GlcN6P} = K_R$ .

Recently, our group showed that the active site lid was highly disordered in the  $T$ -conformation (14). This probably contributes significantly to the free-energy change of the whole allosteric transition and it could account for most of the entropic term in the allosteric transition. The purpose of this research is to provide a thermodynamic description of the allosteric equilibria of *E. coli* GlcN6P deaminase and quantitatively define the relative contributions of the entropic and enthalpic components to the free energy change associated with the allosteric transition.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Biochemicals.** Most biochemicals were purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Edo. Mex., Mexico). *N*-6-Aminohexanoylglucosamine-6-*P* agarose, was prepared as previously described (10, 11).

**Enzyme expression, purification, and assay.** GlcN6P deaminase was obtained from a strain which overproduces the enzyme, as previously described (15) and purified by allosteric affinity chroma-

tography, as previously reported (10). Rate measurements were made in 50 mM Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA and adjusted to pH 7.5 for each temperature with an appropriately calibrated pH meter, in the range 20–40°C. Reaction rates were measured by determining the amount of Fru6P formed at a fixed time, as previously reported (10). The progress of the reaction was always kept below 5% conversion of the initial amount of substrate. Assays were carried out in thermostated water bath that controlled the temperature within  $\pm 0.05^\circ\text{C}$ . The reaction mixtures were preincubated to equilibrate their temperature with that of the bath and all temperatures were monitored by means of calibrated thermocouples. The instability of GlcN6P at pH 7.5 becomes critical at temperatures higher than 315 K (40°C), thus setting a higher limit to our experimental range. Kinetic data were analyzed by nonlinear regression analysis with a commercial program formulated with the algorithm of Marquardt (16).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Thermodynamic Study of Substrate Binding

The allosteric activator of GlcN6P deaminase, GlcNAc6P, is an exclusive-binding ligand (10, 11). This implies that at saturating GlcNAc6P concentration, the allosteric equilibrium is quantitatively shifted to the  $R$  state and the enzyme displays hyperbolic kinetics. Under these conditions, the  $K_m$  for GlcN6P is identical to  $K_R$ . As expected for a pure  $K$ -system, as is the case for *E. coli* GlcN6P deaminase, the  $k_{cat}$  value obtained under hyperbolic kinetics is the same as the corresponding value found under sigmoidal kinetics.

From independent experiments performed in the absence of GlcNAc6P, we can fit the data to the following form of the MWC equation (2):

$$v_0 = \frac{k_{cat}[E_t]n(Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1} + \alpha(1+\alpha)^{n-1})}{L(1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n}, \quad [1]$$

where  $\alpha$  is the specific concentration of the substrate ( $[S]/K_R$ ),  $c$  is the nonexclusive binding coefficient (defined as  $K_R/K_T$ ), and  $L$  is the MWC allosteric constant,  $[T_0]/[R_0]$ . We will use the symbols  $K_R$  and  $K_T$  for the corresponding  $K_m$  values for the  $R$  or  $T$  allosteric state. Being deaminase a homohexamer,  $n$  can be fixed as six. As  $k_{cat}$  and  $K_R$  for the  $R$  state are obtained from independent experiments, the analysis of data obtained under sigmoidal kinetics requires the fitting of only two parameters,  $c$  and  $L$ .

The study of the temperature dependence of  $K_R$  and  $K_T$  for *E. coli* GlcN6P deaminase reveals that temperature mainly affects  $K_T$  in the range 295.5–310.5 K (22.6–37.6°C) (Fig. 1). The corresponding values for  $\Delta H^{\circ}$  and  $\Delta S^{\circ}$  for GlcN6P binding to either conformational state of the enzyme are shown in Table I. Substrate binding to the  $R$  state is endothermic and it is significantly driven by the entropic component. On the other hand, substrate binding to the  $T$  state is exothermic and the entropic term is negative.

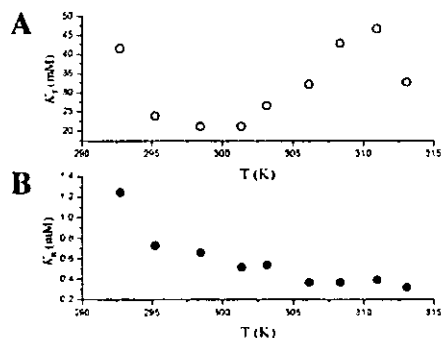


FIG. 1. Temperature dependence of substrate dissociation constants of *E. coli* GlcN6P deaminase: (A)  $K_T$  (○) and (B)  $K_R$  (●), for their respective allosteric conformations at pH 7.5.

Far away from equilibrium, the concentration of the enzyme in the  $R$  conformational state is negligible in the absence of the allosteric activator. Under these conditions the substrate ( $S$ ) will bind mainly to the  $T$  form of the enzyme and the  $[TS]$  complex will be present at a very low concentration. The corresponding  $\Delta G'$  is defined by:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{[TS]}{[S][T]}, \quad [2]$$

and it will be negative because  $[TS]/[S][T] \ll 1$ .

#### Effect of Temperature on Homotropic Cooperativity

Cooperativity can be measured by the value of  $h$ , the Hill coefficient at the inflexion point of the Hill plot (5). In the framework of MWC model, cooperativity depends on parameters  $n$ ,  $c$ , and  $L$ .

As pointed out in the introduction,  $\ln c = \Delta G'_w/RT$ , where  $\Delta G'_w$  is Wyman's free energy of subunit interaction. It measures, in terms of free energy, the difference between the substrate affinities of each allosteric conformer of the enzyme. This value comes from an intrinsic thermodynamic property of each allosteric state and it is not directly related to the conformational transition. The plot of  $\Delta G'_w$  versus  $T$  (Fig. 2) shows that this free-energy change is the main cause of the temperature dependence of  $h$  (inset of Fig. 2). The variation of  $\Delta G'_w$  with temperature appears to be sigmoidal and reaches a minimum value at temperatures over 310 K (36.8°C). This defines a sharp optimal temperature for GlcN6P deaminase cooperativity and corresponds to a  $\Delta G'_w$  of  $-12.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

#### The Temperature-Dependence of the Allosteric Constant $L$

$L$  is defined as the ratio of the enzyme concentration in the  $T$  state to the corresponding concentration in the

$R$  state. In the absence of ligands,  $L = L_0 = [T_0]/[R_0]$ . When  $i$  (from 0 to  $n$ ) molecules of substrate are bound, a set of new allosteric constants can be calculated as  $L_i = L_0 c^i$  (17). From this expression and experimental fitted values for the temperature-dependence of  $L_0$  and  $c$ , we can draw the plot shown in Fig. 3. For the allosteric transition from  $T$  to  $R$ , we can write,

$$\ln L_i^{-1} = -\ln L_0 - i \ln c \quad [3]$$

and as  $L_i$  values are true equilibrium constants, they are related to the standard free energy change of the process by

$$\Delta G'_i = -RT \ln L_i^{-1}, \quad [4]$$

which also may be written as

$$\Delta G'_i = \Delta H'_i - T\Delta S'_i. \quad [5]$$

From Eqs. [4] and [5] and substituting  $L_i^{-1}$  value in 3, we have

$$\Delta G'_i = RT \ln L_0 + iRT \ln c. \quad [6]$$

$RT \ln c$  is Wyman's free energy of subunit interaction,  $\Delta G'_w$ , and  $RT \ln L_0 = \Delta G'_0$ , that is,  $\Delta G'_i$  when  $i = 0$ , defined for the  $T \rightarrow R$  allosteric transition of the ligand-free allosteric conformers. We can then write,

$$\Delta G'_i = \Delta G'_0 + i\Delta G'_w. \quad [7]$$

This equation describes the free energy change of the allosteric transition for each occupation state of the enzyme. The change of  $\Delta H'_i$ ,  $-T\Delta S'_i$  and  $\Delta G'_i$  for each occupation state of the hexamer are shown in Fig. 4.  $\Delta G'_i$  and  $-T\Delta S'_i$  values were calculated for the temper-

TABLE I  
Thermodynamic Standard Parameters for Enzyme-Substrate Binding in the  $R$  and  $T$  Conformational States of *E. coli* GlcN6P Deaminase<sup>a</sup>

Conformational state	$\Delta H^{\circ'}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^{\circ'}$ (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$R$ state	36.0 ± 3.2	0.18 ± 0.01
$T$ state	-55.2 ± 5.1	-0.15 ± 0.03

<sup>a</sup> Enthalpic and entropic standard parameters for enzyme-substrate binding in the  $R$  and  $T$  states at pH 7.5. van't Hoff plots for  $K_R$  and  $K_T$  obtained at different temperatures were used to estimate  $\Delta H^{\circ'}$  and  $\Delta S^{\circ'}$  through the fitting to function:  $\ln(K_X^{-1}) = -\Delta H^{\circ'}/RT + \Delta S^{\circ'}/R$ , where  $K_X$  is  $K_R$  or  $K_T$  and  $R$  is the gas constant (8.31 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). We used  $\ln(K_X^{-1})$  as the independent variable instead of  $\ln K_X$  to obtain binding parameters.

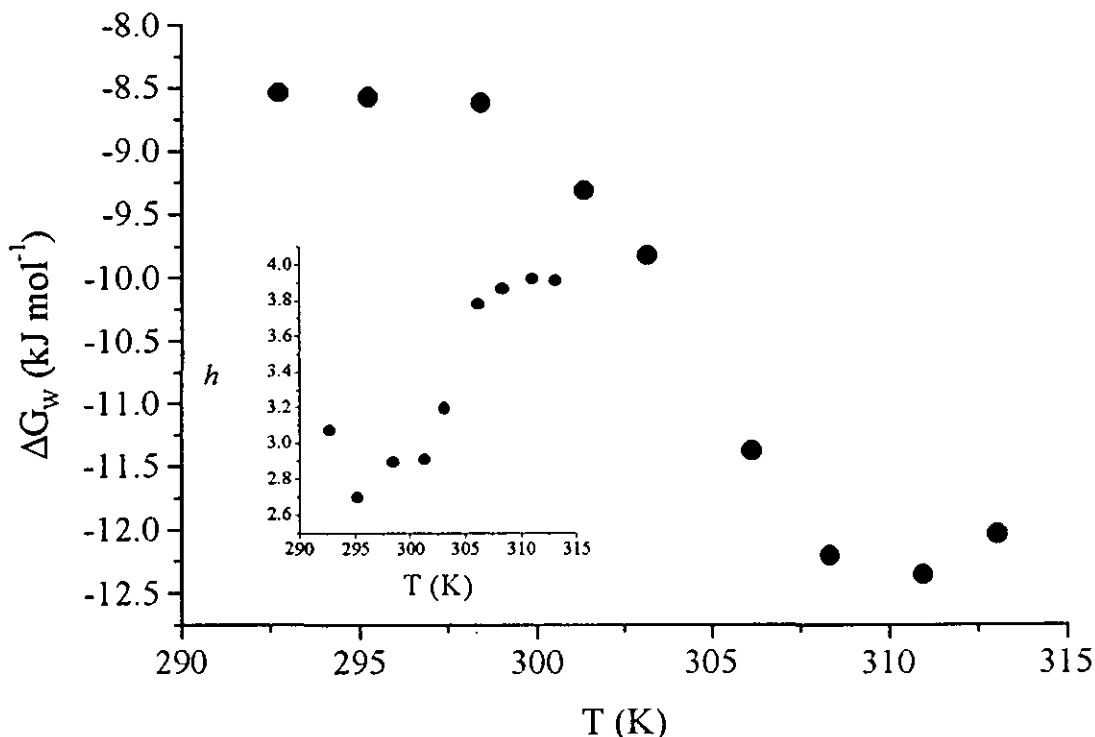


FIG. 2. Temperature-dependence of homotropic cooperativity of *E. coli* GlcN6P deaminase measured through  $\Delta G_w$  (see definition in the text) at pH 7.5. The inset shows the change of Hill coefficient ( $h$ ) with the temperature under the same experimental conditions.

ature of maximum cooperativity, 37.5°C (310.6 K). As the fractional saturation of the protein increases, the entropic component favors the allosteric transition while the enthalpic components become positive. This implies that the allosteric transition is essentially entropy-driven for this enzyme;  $\Delta H'_i$  and  $\Delta S'_i$  values revert their signs when half of the sites are occupied.

The allosteric constant  $L_0$  makes a small contribution to temperature dependence of deaminase cooperativity due to the relative small change in its value with temperature.  $L_i$  values show a more direct dependence on temperature because their values drop (and become  $<1$ ) as the number of bound substrate molecules increase.

#### Possible Structural Basis of the Entropy-Driven Allosteric Conformational Change

The analysis of the structural models of *E. coli* GlcN6P deaminase in its *R* and *T* states, can be of help to correlate the critical entropic component involved in the *T*-*R* transition described in this paper, with observed structural changes in the protein. The comparison of both extreme crystallographic structures of the *R* and *T* forms of *E. coli* GlcN6P deaminase shows a conspicuous quaternary change that can be described as a rotation of each subunit around an axis perpendicular to the sixfold symmetry axis of the oligomer.

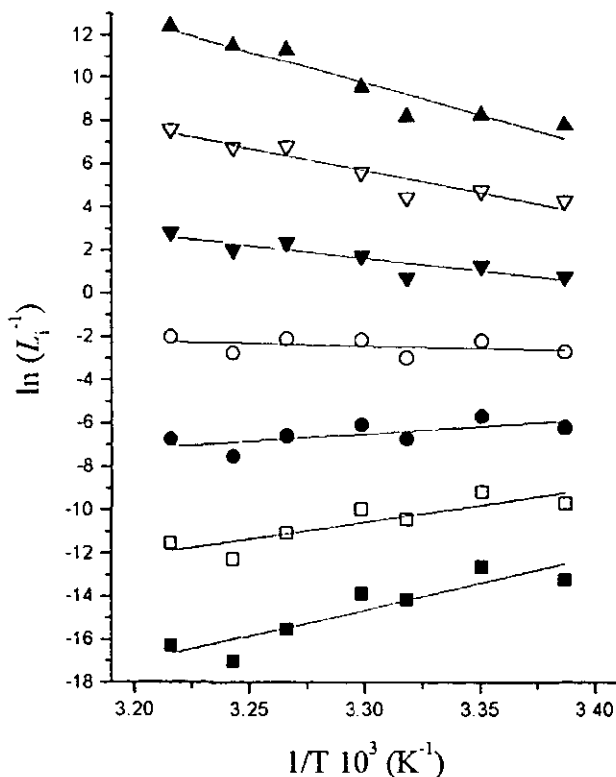
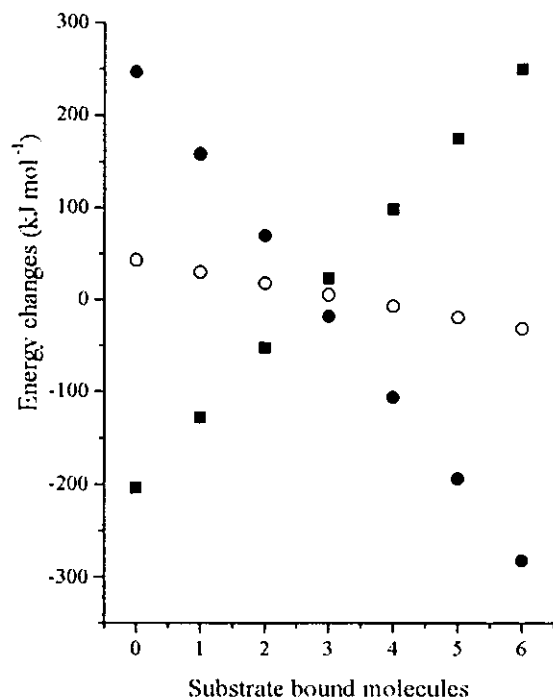


FIG. 3. Van't Hoff plots of  $L_i^{-1}$  values from  $L_0$  (ligand-free enzyme) to  $L_6$  at pH 7.5.  $i = 0$  (■),  $i = 1$  (□),  $i = 2$  (●),  $i = 3$  (○),  $i = 4$  (▼),  $i = 5$  (▽),  $i = 6$  (▲).





**FIG. 4.** Energy variations for allosteric transition  $T \rightarrow R$  according to the substrate occupation.  $\Delta G_i'$  (○),  $\Delta H_i'$  (■), and  $-T\Delta S_i'$  (●) at pH 7.5 were calculated from van't Hoff plots of the allosteric constants ( $L_i^{-1}$ ) and then fitted to equation:  $\ln(L_i^{-1}) = -\Delta H_i'/RT + \Delta S_i'/R$ .  $\Delta G_i'$  and  $-T\Delta S_i'$  were calculated at 310.6 K.  $\Delta H_i'$  and  $\Delta S_i'$  for  $i = 0$  are  $-191.09 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $-784.27 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ .

Other local geometrical changes occur in each subunit, involving mainly the loop 144–154 (14). An additional difference between the crystallographic models for  $R$  and  $T$  states involves the motif forming the lid of the active site. This motif is formed by residues 162–185, and its flexibility increases in the  $T$  state, as indicated by the very high B factors of its atoms in this conformational state. These changes in the lid flexibility could be the structural basis of the decisive contribution to the entropic term in the allosteric conformational changes of this enzyme. Further studies, physicochemical or crystallographic, will be needed to define the changes of mobility of the active-site lid in either

allosteric conformational state. Furthermore, engineering of the lid structure, for example, by modifying its anchoring points to the protein core, will be of help to prove the proposed thermodynamic component of this motif.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Drs. D. Alejandro Fernández, Jacqueline A. Plumbridge, and Miguel Costas for the critical reading of the manuscript and many interesting discussions. They also acknowledge Laura I. Álvarez-Añorve, who produced the enzyme for this research. This paper was supported by a grant from the National University of Mexico (DGAPA-UNAM Project No. IN-212799) and CONACyT (Project No. 25258-N). I.B.J. received a Ph.D. student fellowship also from CONACyT and a student research grant from the program PAEP (DGEF, UNAM).

#### REFERENCES

- Freire, E. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11680–11682.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965) *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118.
- Perutz, M. F. (1990) *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Goodsell, D. S., and Olson A. J. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 105–153.
- Wyman, J. (1964) *Adv. Prot. Chem.* **19**, 223–286.
- Consler, T. G. (1992) *Biochemistry* **31**, 7870–7878.
- Hofrichter, J. (1991) *Biochemistry* **30**, 6583–6598.
- Levitzki A., and Koshland D. E. (1972) *Biochemistry* **11**, 241–246.
- Rose, I. A. (1975) *Adv. Enzymol.* **43**, 491–517.
- Calcagno, M. L., Campos, P. J., Mulliert, G., and Suástegui, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165–173.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E., and Calcagno, M. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 6074–6082.
- Montero-Morán, G. M., Horjales E., Calcagno, M. L., and Altamirano, M. M. (1998) *Biochemistry* **37**, 7844–7849.
- Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., and Horjales, E. (1995) *Structure* **3**, 1323–1332.
- Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt R. C., and Glaucius O. (1999) *Structure* **7**, 527–537.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Hernández-Arana, A., and Calcagno, M. L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 226–272.
- Marquardt, D. W. (1963) *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431–441.
- Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*, Chap. 7, pp. 422–457. Wiley-Interscience, New York.

## **2- Sobre el papel de la movilidad de la tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa de *E. coli***

El papel de la tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa se estudió con ayuda de la mutante Phe174-Ala. La cadena lateral del residuo Phe174 establece contactos hidrofóbicos con el resto de la enzima de modo que la mantiene parcialmente anclada. La enzima mutante perdió la capacidad de unir ligandos de sitio activo y la recupera a través de la unión del activador al sitio alostérico. Convirtiendo al activador alostérico en un activador esencial. La movilidad alterada de la tapa del sitio activo se constató con un estudios cristalográficos y de dicroísmo circular. Este trabajo ha sido enviado para revisión al *Journal of Molecular Biology* (se adjunta copia del manuscrito).

# On the role of the conformational mobility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase

**Running title:** Active-Site Lid of Glucosamine-6-*P* Deaminase . . .

**Keywords:** Active-site lid, conformational mobility, conformational flexibility, allosteric transition, glucosamine 6-*P* deaminase

Ismael Bustos-Jaimes<sup>†\*</sup>, Alejandro Sosa-Peinado<sup>‡</sup>, Enrique Rudiño-Piñera<sup>§</sup>, Eduardo Horjales<sup>§</sup> and Mario L. Calcagno<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>Laboratorio de Fisicoquímica y Diseño de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), P.O. Box 70-159, Ciudad Universitaria, Mexico City, D.F., 04510, Mexico and <sup>§</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), P.O. Box 510-3, Cuernavaca, MOR, 62271, Mexico.

\*Corresponding author, e-mail: ismaelb@servidor.unam.mx.

## (Summary)

The active site of glucosamine-6-*P* deaminase from *Escherichia coli* (GlcN6*P* deaminase, EC 3.5.99.6) has a complex lid formed by two antiparallel  $\beta$ -strands connected by a loop-helix-loop segment (158-187). This motif contains Arg172, which is residue involved in binding the substrate in the active-site, and three residues that are part of the allosteric site, Arg158, Lys160 and Thr161. This dual binding role of the motif forming the lid, suggests that it plays a key role in the functional coupling between active and allosteric sites. Previous crystallographic work showed that the temperature coefficients of the active-site lid are very large when the enzyme is in its T allosteric state. These coefficients decrease in the R state, thus suggesting that this motif changes its conformational mobility as a consequence of the allosteric transition. In order to explore the possible connection between the conformational mobility of the lid and the function of the deaminase, we constructed the site-directed mutant Phe174-Ala. Phe174 is located at the C-end of the lid helix and its side chain establishes hydrophobic interactions with the remainder of the enzyme. The crystallographic structure of the T state of Phe174-Ala deaminase was determined at 2.02 Å- resolution; it shows no density for residues 162 to 181 and high temperature factors as well as weak density in the segments 160-162 and 182-184 (PDB 1JT9). This mutant form of the enzyme is essentially inactive in the absence of the allosteric activator, *N*-acetylglucosamine-6-*P* although it recovers its activity up to the wild-type level in the presence of this ligand. Spectrometric and binding studies show that inactivity is due to the inability of the active-site to bind ligands when the allosteric site is empty. These data indicate that the conformational mobility of the active-site lid critically alters the binding

properties of the active site and that the occupation of the allosteric site restores the lid mobility to a functional state.

## Introduction

During their catalytic cycle, enzymes undergo conformational changes, that are critical for their function. Proteins are non-rigid or even "floppy" structures, while substrates are usually less flexible. Therefore, the formation of enzyme-substrate complexes is accompanied by local structural changes that are usually restricted to the active site region, or close to it. The structural changes (called induced fit) are driven by ligand binding-energy<sup>1</sup>. These local structural changes sequester the bound substrates and reaction intermediates from bulk solvent, stabilising intermediates or transition states for efficient catalysis. Mobile structures allow substrates to diffuse into the active site and subsequently become surrounded by the protein. In many enzymes the conformational changes associated with catalysis depend upon the presence of a hinge, that is, a specific flexible segment in the structure. Protein hinges may modulate domain displacements, or conformational changes of protein motifs smaller than domains, which have been described as active-site lids<sup>2</sup>. There is a considerable variation in the mobile or flexible structures in the active site of enzymes with open  $\alpha/\beta$  fold. The most studied lid in this structural family is that of lipases, which contains an  $\alpha$ -helix whose motion is an essential part of the catalytic mechanism<sup>3</sup>.

Glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6P deaminase, EC 3.5.99.6), an allosteric enzyme converting GlcN6P into Fru6P and ammonia, is a three-layer sandwich  $\alpha/\beta$ -protein. GlcN6P deaminase from *Escherichia coli* has been extensively characterized both

structurally<sup>4,5</sup> and kinetically<sup>6-9</sup>; it is a homohexameric enzyme allosterically activated by *N*-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc6*P*). This enzyme behaves as a classic allosteric *K*-system *i.e.* its regulation is the result of a change in its apparent affinity for the substrate produced by the allosteric transition, without change in the catalytic constant. GlcN6*P* deaminase molecule has a complex structure that completes and closes the active site that can be recognised as an active-site lid. This motif, made up of amino acids 158-187, is formed by two antiparallel  $\beta$ -strands connected by a loop-helix-loop segment (Figure 1). The helix-loop segment (164-182) is connected to the remainder of the structure by  $\beta$ -strands at the C- and the N-termini of the helix-loop motif. These two strands are part of a small three-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet that includes the active-site residue Asp72. This residue provides the general base that catalyses the enolisation of the substrate by abstraction of a proton<sup>4,8</sup>. The 10-residue long  $\alpha$ -helix in the lid (164-174) is anchored to the rest of the enzyme by a hydrophobic interaction built by the side chain of Phe174, which is buried in an uncharged pocket (Figure 2). This helical segment also contains Arg172, which is one of the charged residues binding the  $-OPO_3^{2-}$  group of the substrate, GlcN6*P*. The  $\beta$ -strand at the N-terminus of the lid motif includes the residues Arg158 and Lys160, each contributing a positive charge to the allosteric-activator binding site. This strand also contains Thr161, which is hydrogen-bonded through its side-chain to the acetamido oxygen of the allosteric activator, GlcNAc6*P*<sup>4</sup>. The allosteric transition of the GlcN6*P* deaminase has been described as a rigid body rotation of two regions in each enzyme subunit. This rotation occurs about an axis parallel to the three-fold axis of the hexamer<sup>5</sup>. The comparison of the crystallographic coordinates of the enzyme in its T and R state, also shows that the allosteric transition causes distinct changes in the tertiary

structure, mainly in the loop 136-158, which contains catalytic residues<sup>9</sup>. In contrast, the active-site lid does not display a well-defined conformational change in the transition from the T to the R allosteric state. Moreover, the atoms in its central segment (the helix-loop 164-182) show a marked decrease in their flexibility, as indicated by the lower values of their crystallographic B factors in the R state. This is the sole structural change in the lid motif associated with the allosteric transition that is revealed by crystallographic studies<sup>7,10</sup>; it can be described as a change in conformational mobility rather than a precise geometrical displacement.

In the present research we have studied the role of the mobility of the active-site lid on the kinetic behaviour of *E. coli* GlcN6P deaminase. The analysis of the structural models of the enzyme shows that the side chain of Phe174 in the mobile segment of the lid, builds up hydrophobic interactions with the remainder of the protein (Figure 2). Taking advantage of this feature, we designed the mutant Phe174-Ala with the purpose of increasing the mobility of the lid. The study of this mutant shows that the lid flexibility plays a crucial role in catalysis and the functional connection between the allosteric and the active site in GlcN6P deaminase.

## **Results and discussion**

### **The crystallographic data for Phe174-Ala mutant in its T state reveals a lack of electronic density in the active-site lid**

The crystallographic structure of the mutant enzyme Phe174-Ala was determined at 2.02 Å-resolution from a ligand-free enzyme crystal (Table 1, PDB entry 1JT9). This structure corresponds to the T form of the enzyme, but it lacks any electronic density in the segment

corresponding to the residues 163-182. This segment is part of the motif forming the active-site lid. Figure 3 shows the electron-density map for the mutant enzyme, where the missing segment is shown as the  $\alpha$ -carbon trace of the corresponding segment in the wild-type deaminase in the T state.

Many unsuccessful attempts were made to crystallise the Phe174-Ala mutant enzyme in its R allosteric state by saturating it with active- or allosteric-site ligands. Many conditions were tried, with acetate or phosphate salts as precipitants at a variety of concentrations and pH values, and adding high concentrations of GlcNAc6*P*, Fru6*P* or 2-amino-2-deoxyglucitol 6-*P* (GlcN-ol-6*P*, a competitive inhibitor). It should be recalled that phosphate ion is a low-affinity ligand that binds to both allosteric- and active site<sup>4</sup>.

The observed absence of any electronic density for the segment 163-182 in the active-site lid of the mutant enzyme proves how this hydrophobic interaction is necessary to maintain the lid structure in the wild-type ligand-free enzyme. High temperature factors, as well as low electron-density are found in the active-site lid segments 160-162 and 182-184, residues that are contiguous to the entirely disordered helix-loop motif. The present results prove that the mutation Phe174-Ala effectively weakens the interaction between the active-site lid and the remainder of the enzyme molecule. This effect of the mutation is restricted to the active-site-lid. The comparison of the model of the mutant enzyme, constructed with the exclusion of the lost segment, with the model of the wild-type enzyme in its T state superposes with a rmsd of 0.20 Å (not shown), indicating that the remainder of the molecule is unchanged by the mutation.



**As a consequence of the Phe174-Ala replacement, GlcNAc6P becomes an essential activator of GlcN6P deaminase**

The mutant Phe174-Ala is essentially inactive when assayed in the absence of its allosteric activator and displays a mixed allosteric activation pattern, changing both  $S_{0.5}$  and  $k_{cat}$  values with increasing allosteric activator concentrations (Figure 4). Only at very high concentrations of GlcN6P, a very low reaction rate can be measured in the absence of GlcNAc6P. In contrast, wild-type deaminase behaves as an allosteric  $K$  system in which  $k_{cat}$  is independent of the activator concentration<sup>6</sup>. When the mutant enzyme was assayed in the presence of a saturating GlcNAc6P concentration, its  $k_{cat}$  attains the same value as that found for the wild-type enzyme (Figure 4 and Table 2). The considerable loss of catalytic activity observed in the absence of the allosteric activator suggests that the mutation produced a disruption of the active-site lid that can be functionally reversed by the addition of GlcNAc6P. Since a low residual activity is detected at very high substrate concentrations, a minor ability of the active site of the mutant enzyme to bind GlcN6P cannot be excluded. However, it could also be due to a heterotropic activation, that is, the activation produced by the low-affinity binding of GlcN6P to the allosteric site.

The increase of  $V_{max}$  produced by the allosteric activation in the mutant enzyme, recalls the behaviour of an essential activator. The observed activation pattern (Figure 4) can be a consequence of the sequential oligomer activation by increasing GlcNAc6P concentration. Assuming that each enzyme subunit is inactive until it binds a GlcNAc6P molecule, the enzyme will behave as a functional hexamer only when it has its six allosteric sites occupied and the six active-site lids have all been restored to a functional state.

### **Occupation of the allosteric site by GlcNAc6P enables the active site to bind the competitive inhibitor**

Direct binding experiments were used to correlate the kinetic effect of the replacement of Phe174 by alanine in GlcN6P deaminase, to its ability to bind the competitive inhibitor GlcN-ol-6P. The binding curves for the <sup>3</sup>H-labelled inhibitor to the wild-type and mutant enzymes show that this active-site ligand is not significantly bound to the Phe174-Ala mutant enzyme in the absence of the allosteric activator (Figure 5). This is similar to the result observed in kinetic experiments; only high concentrations of GlcN-ol-6P produce some binding to the mutant enzyme (less than 0.6 moles per mole of enzyme hexamer). The addition of a saturating concentration of GlcNAc6P allows the mutant enzyme to bind the inhibitor, displaying some positive homotropic co-operativity. The affinity of the active site for GlcN-ol-6P is decreased nearly three fold as a consequence of the mutation (Table 2). These direct binding measurements prove that the low activity observed, in the absence of the allosteric activator, is a consequence of the reduced affinity of the mutated enzyme for active-site ligands. As a direct consequence, the allosteric transition cannot be triggered from the active site.

### **Effect of allosteric- and active-site ligands on the structure of the mutant enzyme: evidence from CD spectral changes.**

The interaction of the allosteric activator and the competitive inhibitor with Phe174-Ala GlcN6P deaminase was analysed by CD spectrometry in the aromatic absorption range. For reference, similar CD titration experiments were performed using the wild-type enzyme. GlcN-ol-6P binding to the wild type enzyme produces an increase of the CD peak at 288-290 nm and an increase in a shoulder at 280 nm (Figure 6A). This shoulder is

absent in the CD spectrum of the Phe174-Ala deaminase, whose spectrum appears essentially unchanged in the range 278-300 nm when GlcN-ol-6P is added up to a concentration of 15 times the corresponding  $K_d$ . These results are consistent with the kinetic and binding behaviour of the mutant enzyme and confirm that it cannot bind active-site ligands in the absence of the allosteric activator.

The CD titration of the wild-type enzyme with the allosteric activator is shown in Figure 7A. The main spectral changes produced by GlcNAc6P binding to the wild-type enzyme are a CD decrease at 268-277 nm with negative peaks at 270 and 275 nm and a decrease of the positive peak at 265 nm. These spectral changes were already reported for the wild-type GlcN6P deaminase<sup>7,11</sup>. The replacement of Phe174 by alanine increases the magnitude of these signals. This change is considerably larger than the effect found for the wild-type enzyme (Figure 7). This noticeable spectral effect produced by GlcNAc6P binding to Phe174-Ala deaminase could be related to the rebuilding of the active site following the occupation of the allosteric site, when the concerted quaternary transition occurs.

The  $V$  effect observed and the inability of the active site to bind its specific ligands in the absence of the activator, suggest that the allosteric transition started by GlcNAc6P does not activate all the active sites in an all-or-none fashion as in the wild-type enzyme. This means that its apparent  $k_{cat}$  becomes dependant on the GlcNAc6P concentration. Taking into account the linkage between the active and allosteric sites created by the residues of the lid motif, it is expected that these functionally linked sites, one allosteric and one catalytic, are those which are structurally connected through the lid motif.

## Active-site lid conformational flexibility and the allosteric coupling in GlcN6P deaminase

The mutation increases the conformational flexibility of the active-site lid so much that no electron density corresponding to the central helix-loop motif (residues 164-183) is observed. The remainder of the lid structure includes two residues, which are located in the inter-subunit cleft and are part of the allosteric site, Arg158 and Lys160, which bind the  $\text{OPO}_3^{2-}$  group of GlcNAc6P and Thr161, whose side-chain hydroxy group is hydrogen-bonded to the carbonyl oxygen of the acetamido group of GlcNAc6P. These residues are part of the a short  $\beta$ -strand (sequence RVKT, 158-161), whose C-terminal end builds a critical hydrogen-bond between the backbone carbonyl group and Tyr254 hydroxy group in the facing subunit, when the allosteric site is occupied and the enzyme is in the R state. In the T state, this phenolic hydroxy group moves as a true molecular switch, and interacts with the backbone carbonyl at position 149, which is part of the loop 136-158 that is a component of the active site<sup>8</sup>. The curves of velocity against substrate concentration for the mutant Tyr254-Phe<sup>12</sup> in the presence of varying concentrations of the allosteric activator are similar to those shown in Figure 4. This suggests that both point mutations, Phe174-Ala and Tyr254-Phe, have a similar effect on the active site. In both cases, the kinetic data suggest that the mutants cannot trigger the allosteric transition from the active site. Although we do not have direct evidence for an effect of the Tyr254-Phe mutant on the mobility of the active-site lid, it is possible that releasing the constraints in the allosteric site at the N-terminal side of the lid motif will increase the mobility of the lid. A crystallographic study of Tyr254-Phe deaminase, in its T and R states will make clear this point.

## Concluding remarks

The present results provide a new insight into the dynamics of allosteric transitions. These were classically analysed as geometrical displacements involving the quaternary structure<sup>13,14</sup> accompanied by local displacements of some segments or motifs, affecting the tertiary structure of the protein. Although this kind of conformational change is an essential part of the allosteric transition in GlcN6P deaminase<sup>5</sup>, we wish to emphasise the different behaviour of the active site lid. This motif does not produce a well-defined open-closed transition, but it displays a noticeable change in its flexibility or mobility. In a recent crystallographic study<sup>10</sup>, the allosteric transition of this enzyme has been described as a flexibility-driven molecular motion. In agreement with the present results, a thermodynamic study of the allosteric transition of GlcN6P deaminase from *E. coli* revealed that the whole Gibbs energy change is driven by its entropic component<sup>15</sup>. This entropic dependence of the allosteric transition suggests that the variation in conformational flexibility in specific components of the molecule plays an essential role in the function of this enzyme.

## Materials and Methods

### Reagents

Most chemicals and biochemicals were from Sigma-Aldrich S.A. de C.V, Mexico. The affinity gel used for GlcN6P deaminase purification (*N*-aminohexanoylglucosamine-6P agarose) was prepared as described<sup>6</sup> with further modifications<sup>12</sup>. The dead-end inhibitor,

GlcN-ol-6P, was synthesised according to Midelfort and Rose<sup>16</sup>; its <sup>3</sup>H-labelled form (274 kBq  $\mu\text{mole}^{-1}$ ) was obtained with the same procedure, using <sup>3</sup>H-NaBH<sub>4</sub> as reducer.

### **Bacterial strains and mutagenesis**

Site directed mutation Phe174 (TTT) to Ala (GCT) was obtained by oligonucleotide-directed mutagenesis, using Stratagene QuickChange<sup>®</sup> reagents as described by the manufacturer, to mutate the *nagB* gene inserted in the vector pTZ18R. The plasmid carrying the mutation was verified by sequencing and used to transform the  $\Delta$ *nag* strain IBPC590. This strain is  $\Delta$ *lacI* and expresses the deaminase constitutively. Details on the strain and the procedure were already reported<sup>7</sup>.

### **Enzyme purification**

*E. coli* wild-type GlcN6P deaminase and the site-specific mutant Phe174-Ala, were purified by allosteric-site affinity chromatography as previously reported<sup>12</sup>. The purity of the enzyme preparations was verified by SDS-PAGE. GlcN6P deaminase was assayed in the direction of Fru6P formation, by the measurement of Fru6P concentration at fixed times, as previously reported<sup>6</sup>. The progress of the reaction was always kept below 5 % conversion of the initial amount of substrate. Kinetic data were analyzed by nonlinear regression analysis using the program Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). The amino acid substitution does not affect significantly the molar absorptivity estimated according to Edelhoch<sup>17</sup>, and the corresponding value for the wild-type enzyme ( $20.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) was used to calculate the concentration of the mutant enzyme.

## **Crystallisation and crystallographic measurements**

Crystallisation trials were performed in the presence and absence of the allosteric-site ligand *GlcNAc6P*, or an active-site ligand (*GlcN-ol-6P* or *Fru6P*) or inorganic phosphate that binds to both sites. In all cases in which crystal growth was obtained, the crystals belonged to the space group  $P6_322$ , which is the crystal morphology corresponding to the T form of the enzyme<sup>5</sup>. We tested the diffraction pattern of several crystals to confirm the space group. The crystal used for diffraction data collection was obtained with the hanging-drop vapour diffusion technique, at 18 °C in 2.9 M sodium acetate and 100 mM HEPES buffer at pH 7.0, containing 5 mM *GlcNAc6P*. A diffraction data set at 2.02 Å resolution at line 7-1 (wavelength 1.08 Å) was obtained in the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory. Mineral oil was used as a cryoprotector (Table 1). Attempts to obtain crystals in the allosteric R state were unsuccessful. Only with 4 M phosphate buffer as precipitant at pH values from 7.0 to 8.0, did we obtain microcrystals with a different morphology.

## **Measurement of the dissociation constant of the competitive inhibitor**

Binding of the active-site ligand *GlcN-ol-6P*, a competitive inhibitor, was obtained from radioactive binding measurements of <sup>3</sup>H-labeled *GlcN-ol-6P* at 30 °C, separating the enzyme by ultracentrifugation, as previously described<sup>12</sup>.

## **Binding of *GlcNAc6P* and *GlcN-ol-6P* by circular dichroism spectroscopy**

The dissociation constant of the allosteric activator *GlcNAc6P* and the dead-end inhibitor *GlcN-ol-6P* were determined by near-UV CD spectroscopy using a Jasco J-715 CD spectrometer. Protein samples (10 µM) were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5

and data were collected at 30 °C as described in reference 7. Spectral data were corrected with suitable blanks and for dilution during titration.

## **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge Drs. M. Costas-Basin, D.A. Fernández-Velasco and J.A. Plumbridge for the critical reading of the manuscript and many interesting discussions. They also acknowledge Laura I. Álvarez-Añorve, for her technical assistance. This paper was supported by a grant from the National University of Mexico (DGAPA-UNAM Projects IN-212799 to MLC and IN220896 to EH) and CONACyT (Project No. 25258-N). IBJ and ERP received Ph.D. student fellowships also from CONACyT and student research grants from PAEP (DGEP, UNAM). Part of this work is based upon research conducted at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), which is funded by the Department of Energy (BES, BER) and the National Institutes of Health, NCRR, NIGMS.



## References

1. Fersht, A. R. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H. Freeman & Co., New York.
2. Gerstein, M., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1994). Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry* **33**, 6739-6749).
3. Derewenda, Z. S. (1995). A twist in the tale of lipolytic enzymes. *Nature Str. Biol.* **2**, 347-349.
4. Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. & Horjales, E. (1995). Structure and Catalytic Mechanism of Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* **3**, 1323-1332.
5. Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt R. C. & Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T-state at 2.3 Å-resolution. *Structure*, **7**, 527-537.
6. Calcagno, M. L., Campos, P. J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984). Purification, Molecular and Kinetic Properties of glucosamine 6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.

7. Altamirano M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E. & Calcagno, M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry*, **34**, 6074-6082.
8. Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J.A. & Calcagno, M. L. (2001). On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase, *Biochemistry*, in press.
9. Lara-González, S., Dixon, H.B.F., Mendoza-Hernández, G., Altamirano, M. M. & Calcagno, M. L. (2000). On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**, 219-227.
10. Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S. P. and Horjales, E. (2001). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase, *Acta Crystallogr D*, in press.
11. Woody, R.W. & Dunker, K.A. (1996). Aromatic and Cystine Side-chain Circular Dichroism. In *Poteins In Circular Dichroism and the Conformation Analysis of Biomolecules*, Chapter 4. G.D. Fasman, Editor, Plenum Press, New York and London.
12. Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. & Altamirano, M. M. (1998). Tyr254 Hydroxyl Group Acts as a Two-Way Switch Mechanism in the Coupling of

Heterotropic, Homotropic Effects in *Escherichia coli* Glucosamine-6-phosphate Deaminase.

*Biochemistry* **37**, 7844-7849.

13. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.

14. Perutz, M .F. (1990). *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*. Cambridge University Press. Cambridge. UK.

15. Bustos-Jaimes, I. & Calcagno, M. L. (2001). Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, in press.

16. Midelfort, C. and Rose, I. A. (1977). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* **16**, 1590-1596.

17. Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **7**,1948-1954.

18. Carson, M. (1991). Ribbons 2.0. *J. Appl. Cryst.* **24**, 958-961.

19. Nicholls, A., Sharp, K.A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **4**, 281-296.

20. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110-119.

## Tables

**Table 1. Data collection and refinement statistics.**

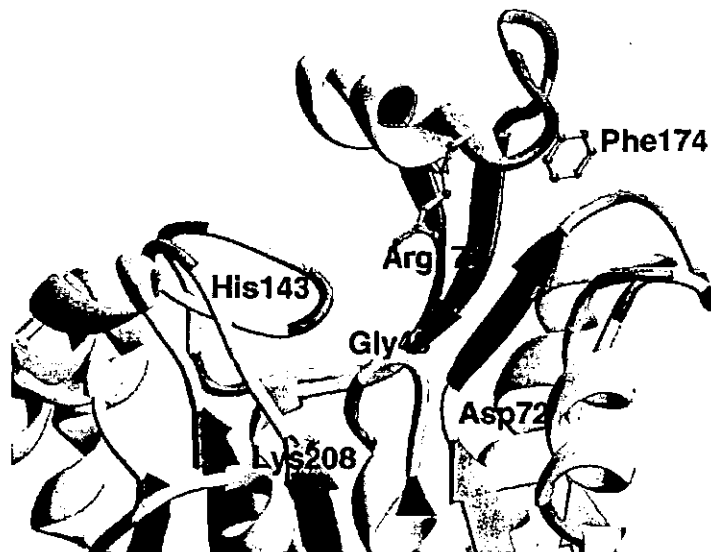
Monomers per asymmetric unit	1
Other non-water atoms in the A.U.	none
Space group	P6 <sub>3</sub> 22
Cell parameters a = b, c (Å) α = β, γ (deg.)	127.61, 139.82 90, 120
Resolution (Å)	50 - 2.02
<i>R</i> <sub>sym</sub>	0.05
<i>R</i> <sub>sym</sub> at highest resolution bin (2.06-2.12 Å)	0.334
Completeness [F/s(F)>1] (%) multiplicity	99.0 3.4
I/s(I) at highest resolution bin (2.3)	11.1
Unique reflections measured	41650
Rigid body minimisation	<i>R</i> = 0.352
Annealing (T <sub>i</sub> = 2000 K)	<i>R</i> = 0.279 <i>R</i> <sub>free</sub> = 0.289
Ligand search and manual modifications	<i>R</i> = 0.262 <i>R</i> <sub>free</sub> = 0.275
Water search	<i>R</i> = 0.213 <i>R</i> <sub>free</sub> = 0.231
DDQ directed model correction and alternate conformations building	<i>R</i> = 0.19 <i>R</i> <sub>free</sub> = 0.21
Water molecules in the asymmetric unit	268
Reflections per atom	18.88

**Table 2.** Kinetic and binding constants for the Phe174-Ala mutant form of GlcN6P deaminase and for wild-type enzyme.

	$K_m^a$ (mM)	$k_{cat}^a$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ GlcN-ol-6P <sup>a, b</sup> ( $\mu$ M)	$K_d$ GlcNAc6P ( $\mu$ M)
Phe174-Ala	$3.43 \pm 0.04$	$163 \pm 7$	$11.0 \pm 1.7$	$139 \pm 18^c$
Wild-type	$0.55 \pm 0.03$	$160 \pm 8$	$3.7 \pm 0.5$	$35 \pm 5^b$

<sup>a</sup> Data obtained in the presence of a saturating concentration of GlcNAc6P; <sup>b</sup> from direct binding experiments; <sup>c</sup> Calculated from the change of  $k_{cat}$  with GlcNAc6P concentration.

## Figures

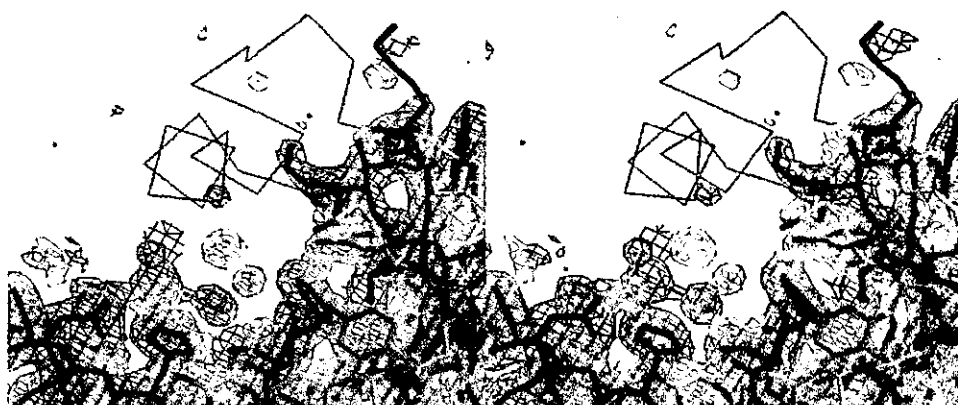


**Figure 1.** The active-site of GlcN6P deaminase in the T state. The active-site lid appears at the top of the image and the side chains of Phe174 and Arg172 are shown. The former is the residue which replacement by alanine disturbs the stability of the lid. Arg172 is involved in binding the  $-OPO_3^{2-}$  group of the substrate in the R state of the enzyme. Some important residues of the active site are indicated. This figure was generated using the program RIBBONS<sup>18</sup>.

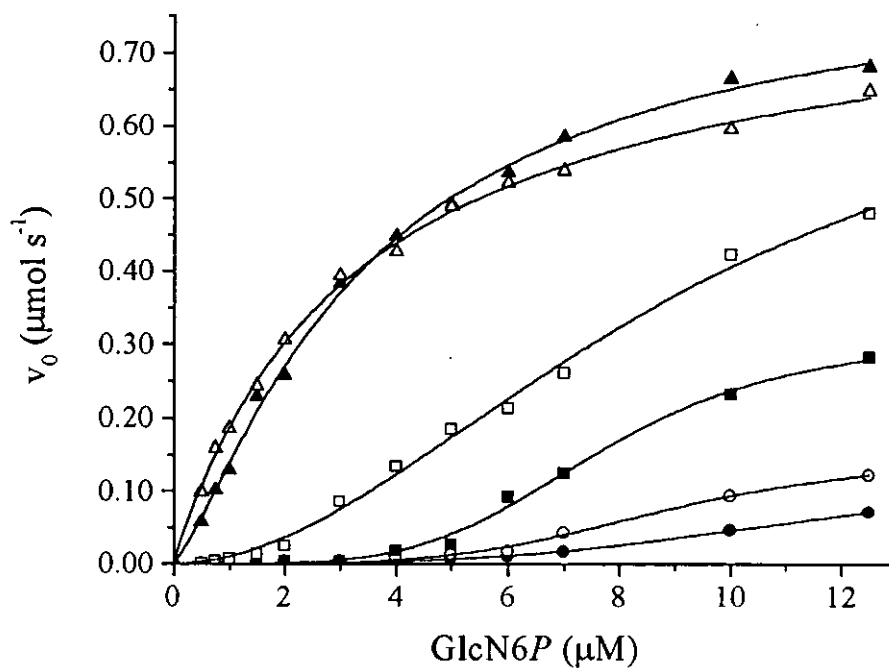


**Figure 2.** Stereo view of the active site lid (in rods) of the T conformer of wild-type GlcN6P deaminase (PDB entry 1FSF). The main chain atoms are shown in green. All side chain atoms appear in atom-type colour colours except those from Phe174, which are coloured in magenta. The remainder of the structure appears as a surface representation coloured according to the net charge. This figure was prepared using the program GRASP<sup>19</sup>.

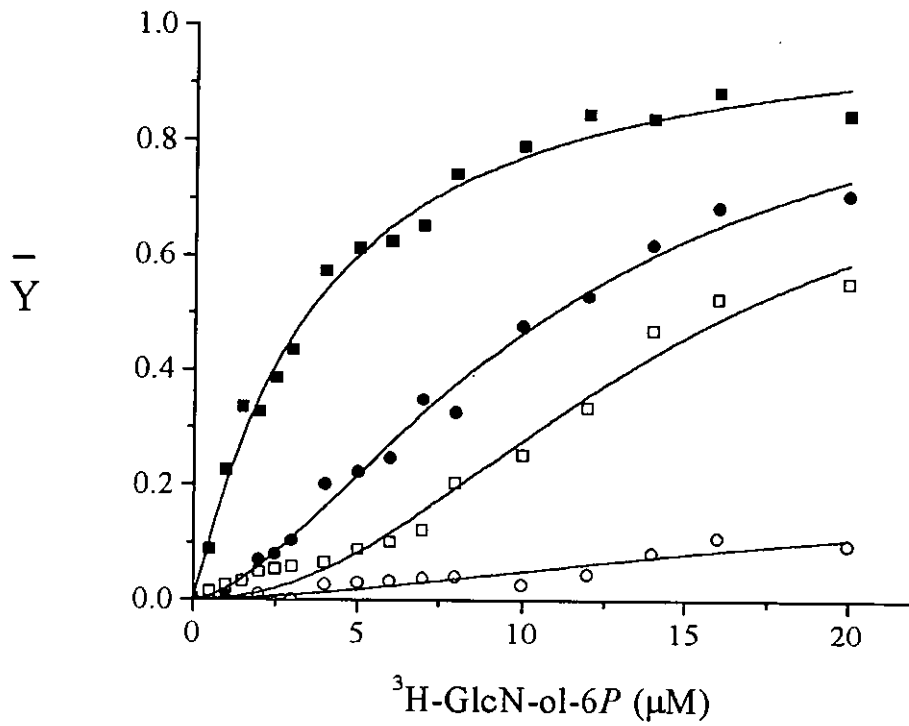




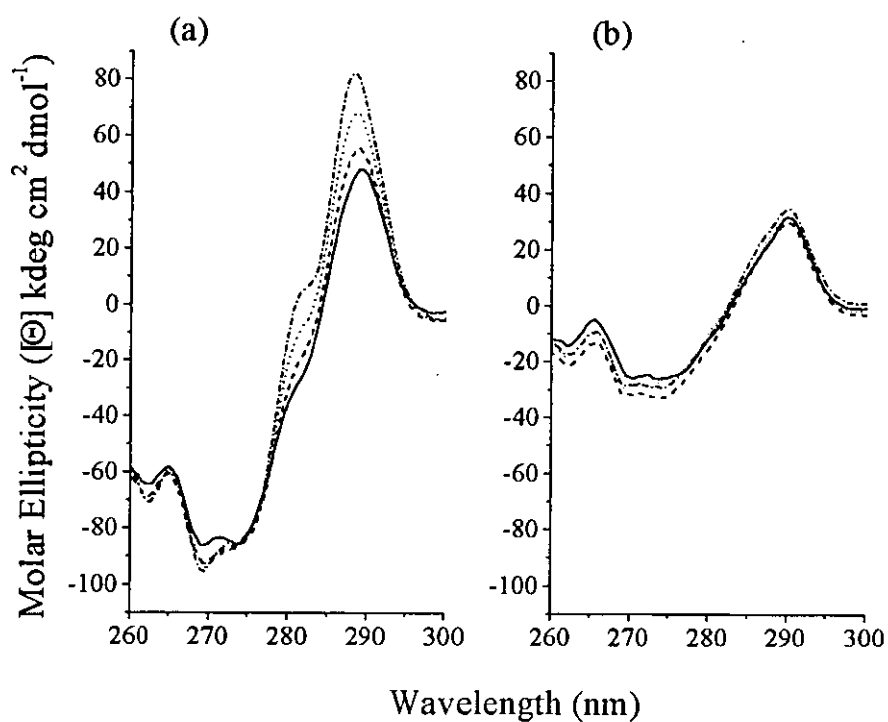
**Figure 3.** Stereo view of the  $2f_0-f_c$  density-map contoured at  $1.0 \sigma$  level of the crystal structure of the Phe174-Ala GlcN6P deaminase. The active site lid corresponding to the structure of the wild-type enzyme (PDB 1FSF) and was drawn using thin red lines. There is no electronic density for this segment in Phe174-Ala deaminase. Figure created using the program O<sup>20</sup>.



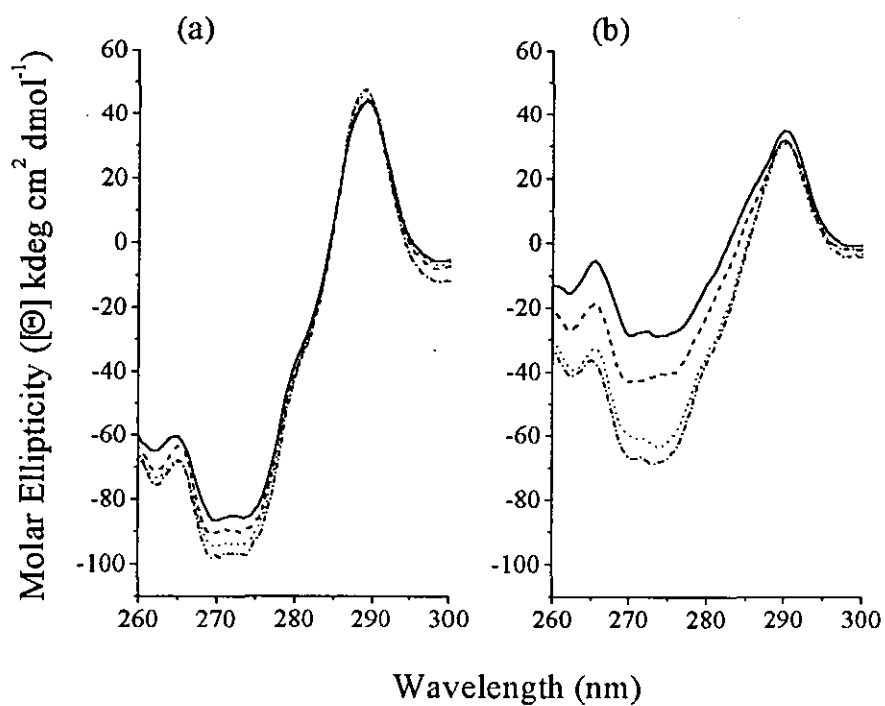
**Figure 4.** Curves of initial velocity against substrate concentration, obtained at different GlcNAc6P concentrations. Data were fitted to the Hill equation. GlcNAc6P concentrations were, 0 (●), 0.05 mM (○), 0.10 mM (■), 0.20 mM (□), 0.50 mM (▲) and 0.75 mM (△).



**Figure 5.** Binding curves of  $^3\text{H-GlcN-ol-6P}$  to the Phe-174Ala mutant (circles) and wild-type (squares) enzyme. Data were obtained either in presence (full symbols) or absence (empty symbols) of a 1 mM of GlcNAc6P.



**Figure 6.** Near UV CD spectra of wild-type (a) and Phe174-Ala mutant GlcN6P deaminase (b) obtained at different concentrations of the active-site ligand, GlcN-ol-6P. The concentrations of this inhibitor were, 0 (—), 33.0  $\mu\text{M}$  (- -), 76.0  $\mu\text{M}$  (· · ·), and 190  $\mu\text{M}$ , (- · -).



**Figure 7.** Near UV CD spectra of wild-type (a) and Phe174-Ala mutant GlcN6P deaminase (b) obtained at different concentrations of the allosteric activator, GlcNAc6P. 0.00 (—), 0.10 mM (- - -), 0.67 mM (· · ·), and 2.00 mM (- · -).

### 3- Estudio de la movilidad de la tapa del sitio activo asociada a la transición alostérica en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*

La movilidad de la tapa del sitio activo puede ser estudiada a través de las señales fluorescentes provenientes de la unión de ligandos a éste o de señales asociadas a cambios globales que ocurren en la enzima como es la transición alostérica. Se construyeron enzimas mutantes con un solo residuo de Trp en sus posiciones naturales, Trp15 y Trp224, cambiándolos por un residuo de Tyr, asumiendo que es un cambio conservador de la estructura y de las propiedades electrónicas de ambos residuos. También se generó la triple mutante Trp15-Tyr:Phe174-Trp:Trp224-Tyr. La importancia funcional del residuo Phe174 había sido demostrada cinéticamente (ver Anexo 2). De este modo, la presencia de un residuo con propiedades fluorescentes en la tapa del sitio activo nos podría dar claros indicios de la movilidad de la tapa y su relación con la transición alostérica. Todas las mutantes se caracterizaron cinéticamente para validar su uso como sistema experimental. Para facilitar la lectura de este trabajo se usará un nomenclatura en el que se indique el residuo de Trp que sí se encuentra en la enzima, excepto en el caso de la enzima silvestre:

Enzima	Nombre usado en este documento
Silvestre	Silvestre
Trp224-Tyr	Trp15
Trp15-Tyr	Trp224
Trp15-Tyr:Phe174-Trp:Trp224-Tyr	Trp174

## Metodología

### *Mutagénesis.*

Se construyeron las mutantes Trp15, Trp224 y Trp174 a partir del plásmido pTZ18R*nagB*, utilizando un *kit* de mutagénesis sitioespecífica (Quickchange, Stratagene Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante excepto para la temperatura de alineamiento de los cebadores mutagénicos con el DNA molde, que fue de 45°C. Esta mutación se verificó por secuenciación del gen completo dentro de los plásmidos mutantes generados, utilizando los cebadores universales para secuenciación en vectores derivados del bacteriófago M13. Posteriormente, se utilizaron los plásmidos mutantes para transformar células competentes de *E. coli* IBPC590. Todos los procedimientos se realizaron con DNA purificado con el *kit* QIAprep (Quiagene Inc.).

### *Producción, purificación y cuantificación de las enzimas.*

La enzima se expresó en *E. coli* IBPC590 y se purificó en una columna de afinidad alostérica como se ha descrito previamente (Montero-Morán y col, 1998), obteniéndose una especie electroforéticamente pura. Para determinar la concentración de las mutantes con un solo triptofano, se calculó la absortividad molar a 278 nm ( $\epsilon_{278}$ ) mediante la reacción de los residuos de cisteína con 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB). La enzima nativa en ausencia de ligandos presenta dos residuos de cisteína reactivos con DTNB. Esto permite calcular su concentración basándonos en el cambio de absorbencia de la muestra a 412 nm por la liberación estequiométrica (1:1) de 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB; Altamirano y col. 1991).

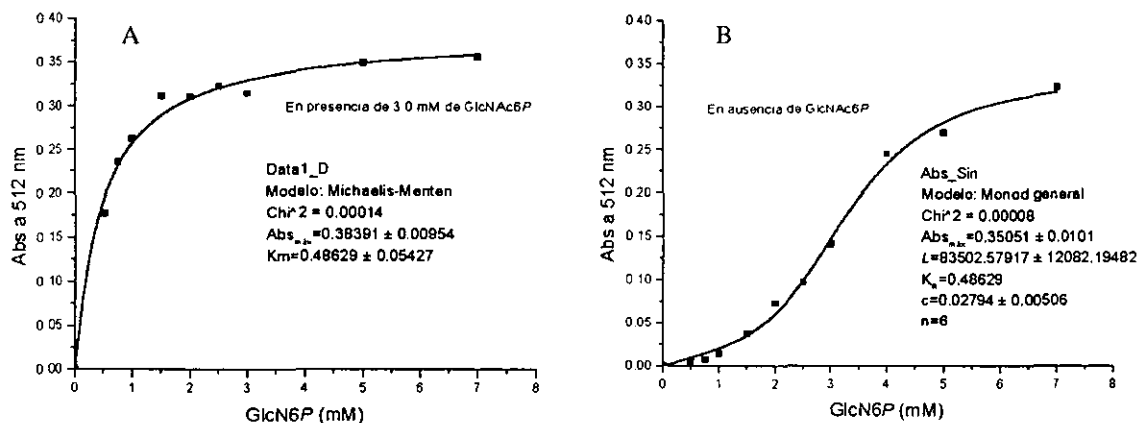
### *Espectros de fluorescencia de las proteínas silvestre y mutantes.*

La fluorescencia intrínseca se midió en un equipo ISS-PC1. Se excitó la fluorescencia de los grupos indol de los residuos de Trp a una longitud de onda de 290 nm, recolectando datos de emisión entre 300 a 350 nm usando tres integraciones por lectura y una lectura por nm. La enzima se usó a una concentración final de 25 µg/mL disuelta en un amortiguador de Tris-EDTA (100 mM y 25 mM), pH 7.5, con los controles necesarios.

## Resultados y discusión

### *Caracterización cinética de las enzimas mutantes.*

La caracterización funcional de las enzimas mutantes nos permite extrapolar su comportamiento estructural al de la enzima silvestre. En la Figura 3 se muestra el comportamiento cinético de la mutante Trp174, demostrando que su comportamiento cinético es similar al de la enzima silvestre (ver Tabla 1). Ésta es una de las mutantes más complejas desde un punto de vista estructural ya que contiene tres mutaciones. Sirve entonces como ejemplo de que el cambio de Trp por Tyr en las posiciones 15 y 224, no altera significativamente el comportamiento cinético de las enzimas (Tabla 1) y además demuestra que las interacciones hidrofóbicas del residuo Phe174 pueden ser producidas por el residuo de Trp insertado en tal posición.



**Figura 3. Patrones de velocidad medida como absorbancia vs concentración de sustrato para la mutante Trp174. A) En presencia de 3 mM de GlcNAc6P y B) en ausencia de GlcNAc6P. Ambos ensayos se realizaron a 30 °C y pH 7.5, 10 min.**



**Tabla 1. Propiedades cinéticas de la GlcN6P desaminasa silvestre y mutantes empleadas en este estudio, a 30 °C y pH 7.5.**

Enzima	$K_R$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$h$	$S_{0.5}$ (mM)	$L$ ( $\times 10^{-6}$ )	$K_T$ (mM)	$c$
Silvestre	$0.55 \pm 0.05$	$158 \pm 8$	$2.9 \pm 0.1$	$5.5 \pm 0.2$	$1.00 \pm 0.019$	$22.0 \pm 2$	$0.025 \pm 0.0002$
Trp15	$0.50 \pm 0.07$	$138 \pm 10$	$2.4 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.3$	$0.08 \pm 0.021$	$16.0 \pm 2$	$0.031 \pm 0.0038$
Trp224	$0.62 \pm 0.09$	$134 \pm 10$	$2.9 \pm 0.2$	$5.8 \pm 0.3$	$0.09 \pm 0.021$	$22.9 \pm 3$	$0.027 \pm 0.0026$
Trp174	$0.49 \pm 0.05$	$80 \pm 3$	$2.9 \pm 0.2$	$3.4 \pm 0.2$	$0.08 \pm 0.012$	$17.1 \pm 2$	$0.028 \pm 0.0051$

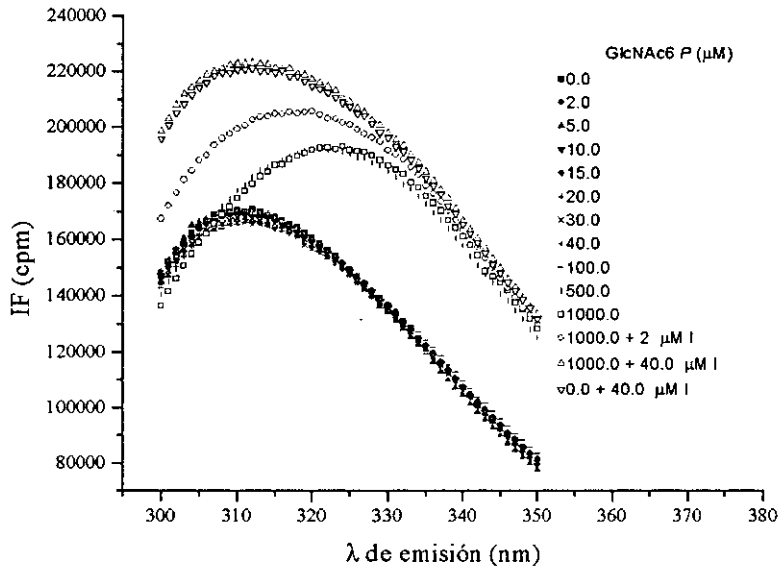
$K_R$ ,  $K_m$  para el conformero R;  $K_T$ ,  $K_m$  para el conformero T;  $h$ , número de Hill;  $L$ , constante alostérica,  $L = [T]/[R]$ ;  $c$ , constante de fijación no exclusiva para el sustrato,  $c = K_R/K_T$ .  $K_R$  y  $k_{cat}$  se obtuvieron en presencia de activador alostérico (cinética hiperbólica) por ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.  $h$  y  $S_{0.5}$  se obtuvieron en ausencia de activador alostérico (cinética sigmoideal) mediante un ajuste a la ecuación de Hill.  $L$ ,  $K_T$  y  $c$  se obtuvieron en ausencia de activador alostérico por ajuste a la ecuación de Monod-Wyman-Changeux.

#### *Fluorescencia intrínseca de la GlcN6P desaminasa silvestre.*

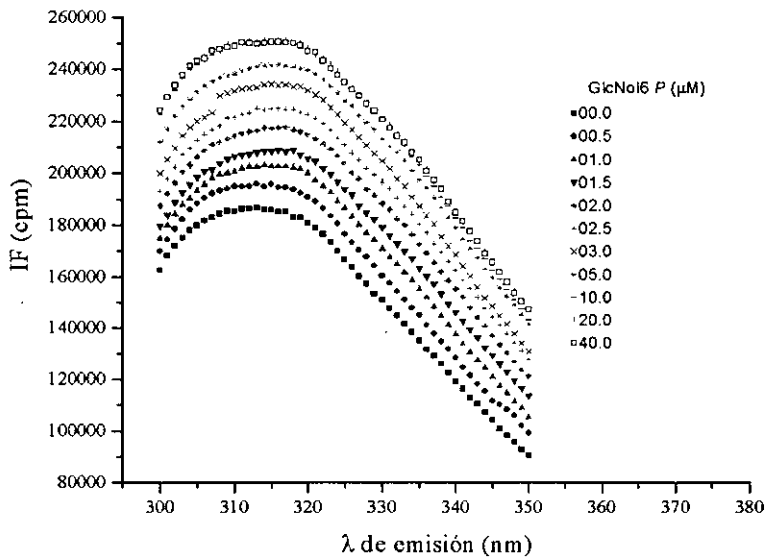
En la Figura 4 se muestran los espectros de fluorescencia intrínseca de la enzima silvestre y su cambio por la adición de ligandos; primero el ligando de sitio alostérico, GlcNAc6P y, posteriormente, a concentraciones saturantes de éste, se adicionó el inhibidor competitivo GlcN-ol-6P, este último a concentraciones subsaturantes y saturantes. Se incluyó también una curva a concentración saturante de GlcN-ol-6P libre de activador para facilitar la comparación. Es notorio que las concentraciones de GlcNAc6P que saturan el efecto cinético (hasta 100  $\mu$ M,  $K_d = 35$  mM) no producen un efecto notorio en la fluorescencia y sólo comienza a presentarse un efecto a concentraciones muy elevadas. Mismas concentraciones de GlcNAc6P que presentan un efecto inhibitorio de tipo competitivo, es decir, es cuando el activador se encuentra en una concentración tan alta que puede unirse al sitio activo. Este cambio de fluorescencia se observa como un desplazamiento hacia el rojo además de un efecto hipercrómico. Al adicionar GlcN-ol-6P a concentración subsaturante, se observa un efecto hipercrómico mayor y además el máximo se desplaza nuevamente hacia el azul (efecto hipsocrómico) sin llegar al punto original. Finalmente, una concentración saturante de inhibidor puede producir el máximo efecto hipercrómico y mantiene el

máximo en su posición original. Este mismo efecto se observa para el inhibidor en ausencia de activador.

Se realizó el mismo experimento con el inhibidor competitivo y se encontró que éste produce un cambio significativo en la fluorescencia intrínseca de la enzima silvestre (Figura 5).



**Figura 4. Espectro de fluorescencia de la enzima silvestre a diferentes concentraciones de GlcNAc6P. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**



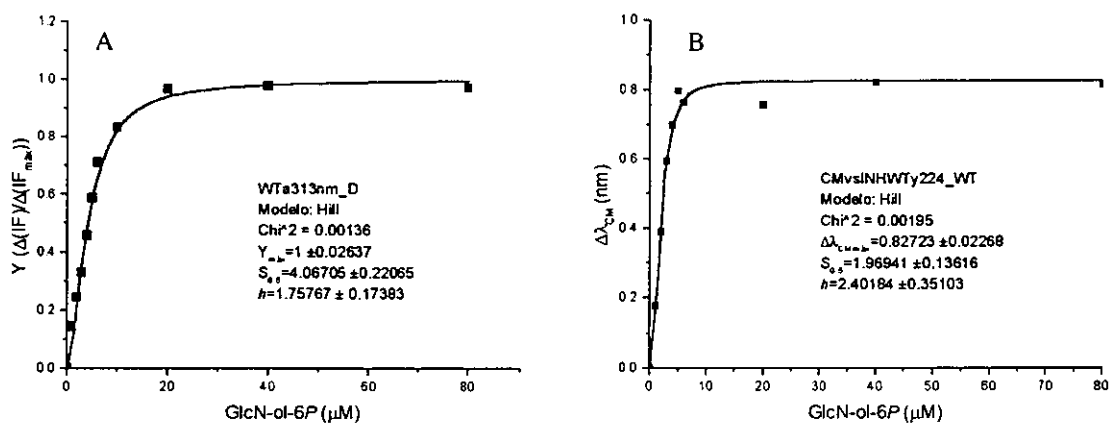
**Figura 5. Espectro de fluorescencia de la enzima silvestre a diferentes concentraciones de GlcN-ol-6P. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

La ocupación del sitio activo por el activador no puede ser igual a la del inhibidor dada la diferencia estructural que existe entre éstos. Pareciera que el activador tiene un efecto similar, pero produce un complejo cuya movilidad es distinta a la producida con el inhibidor, que debe ser similar a la que produce el ligando natural, GlcN6P. La constante de disociación para el complejo con el inhibidor, calculada a través del cambio de fluorescencia, coincide con la constante de disociación del inhibidor calculada por la medición de la unión directa del ligando marcado radiactivamente y con su valor de  $K_i$  como inhibidor competitivo calculado cinéticamente.

La adición de inhibidor competitivo, GlcN-ol-6P, produce cambios de fluorescencia aun cuando el sistema está saturado de GlcNAc6P. Esto sugiere que el inhibidor competitivo está uniéndose al sitio activo y produce un nuevo fenómeno estructural que no puede ser la transición cuaternaria, la cual ya ha ocurrido. En consecuencia se trata de un fenómeno terciario (*induced fit*) a nivel de sitio activo. Es interesante hacer notar que los residuos de Trp que posee esta enzima, Trp15 y Trp224, se encuentran alejados tanto del sitio activo como del alostérico, por lo que este cambio de fluorescencia debe estar asociado a interacciones indirectas causadas por la unión del inhibidor competitivo al sitio activo. La fluorescencia puede analizarse directamente por su cambio de intensidad a una longitud de onda o por el cambio espectral del centro de masa o longitud de onda de emisión promedio ( $\lambda_{CM}$ ), calculada de acuerdo a la expresión  $\lambda_{CM} = \Sigma \lambda * I(\lambda) / \Sigma I(\lambda)$ . Donde  $I(\lambda)$  es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda  $\lambda$ .

La unión del inhibidor competitivo al sitio activo en ausencia de GlcNAc6P produce cambios de intensidad de fluorescencia ( $\Delta I / \Delta I_{m\acute{a}x}$ ) (Figura 6A), y de longitud de onda del centro de masa ( $\lambda_{CM}$ ) (Figura 6B) que parecen ser muy similares y presentan un comportamiento hiperbólico. Sin embargo, el primero se ajusta a la ecuación de Hill mejor que a la de Michaelis-Menten y presenta un  $h_{m\acute{a}x}$  de 1.7, el mismo que se obtiene de la curva de pegue del inhibidor competitivo marcado radiactivamente,  $^3\text{H}$ -GlcN-ol-6P (Figura 7). La cooperatividad implica que el fenómeno de unión del ligando al sitio activo de alguna manera facilita la unión de nuevos ligandos al hexámero, fenómeno que quedó demostrado con el estudio termodinámico que se

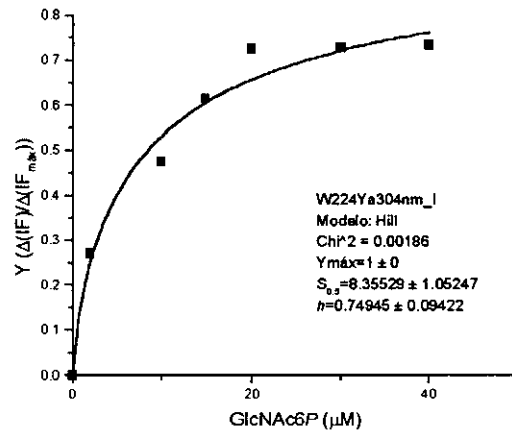
presentó anteriormente como parte de este proyecto (Bustos-Jaimes y Calcagno, 2001). Aunque también podría deberse a un fenómeno de naturaleza distinta, causada por la presencia de 2 residuos de Trp cuyo comportamiento fluorescente podría ser inverso al estar en regiones muy distintas de la molécula. Por estas razones, el comportamiento fluorescente de las mutantes Trp15 y Trp224 nos podrían dar información libre de estas conjeturas.



**Figura 6. Efecto de la unión de GlcN-ol-6P como A) fracción de saturación del cambio de intensidad de fluorescencia y B) cambio de longitud de onda del centro de masa. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

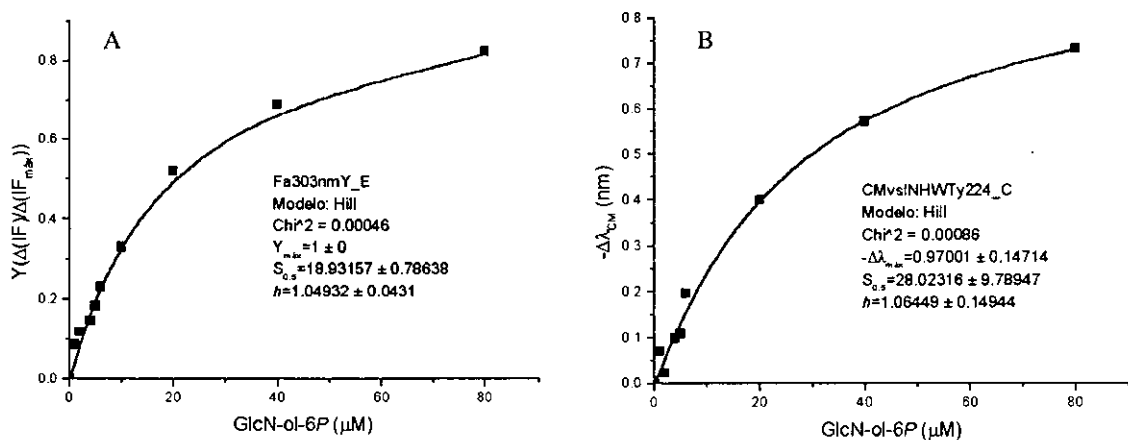
#### *Fluorescencia intrínseca de la GlcN6P desaminasa mutante Trp15*

Para esta mutante, la fracción de saturación de la intensidad de fluorescencia,  $\Delta IF/\Delta IF_{máx}$ , en función de la concentración de GlcNAc6P muestra un comportamiento hiperbólico a concentraciones bajas del ligando, de lo que deducimos que refleja un fenómeno local asociado a la unión del ligando y no a la transición cuaternaria (Figura 7). El valor de longitud de onda del centro de masa del espectro,  $\lambda_{CM}$ , en función de la concentración de GlcNAc6P se mantiene constante en el intervalo de concentraciones usadas.



**Figura 7. Fracción de saturación del cambio de fluorescencia vs GlcNAc6P para la mutante Trp15. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

La unión de GlcN-ol-6P a esta enzima presenta un perfil hiperbólico vista tanto como fracción de saturación a través de  $\Delta(IF)/\Delta(IF_{máx})$ , como de  $-\Delta\lambda_{CM}$  (Figura 8). Se observa que la señal monitoreada por el residuo Trp15 debe ser de carácter local.

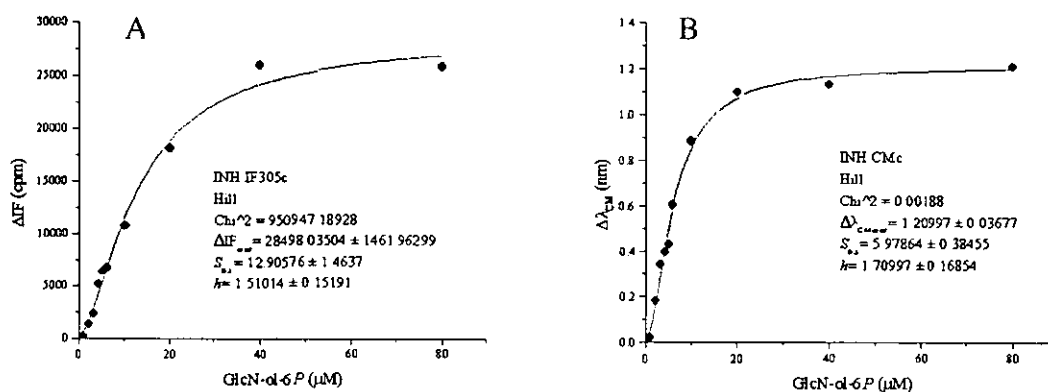


**Figura 8. Efecto de la unión de GlcN-ol-6P como A) fracción de saturación del cambio de intensidad de fluorescencia y B) cambio negativo de longitud de onda del centro de masa en la mutante Trp15. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

El residuo Trp15 produce señales de carácter local, tanto de la unión del activador alostérico como de la unión del inhibidor competitivo, aunque la unión de este último produce además un cambio en el centro de masa de aproximadamente 1 nm.

### *Fluorescencia intrínseca de la GlcN6P desaminasa mutante Trp224.*

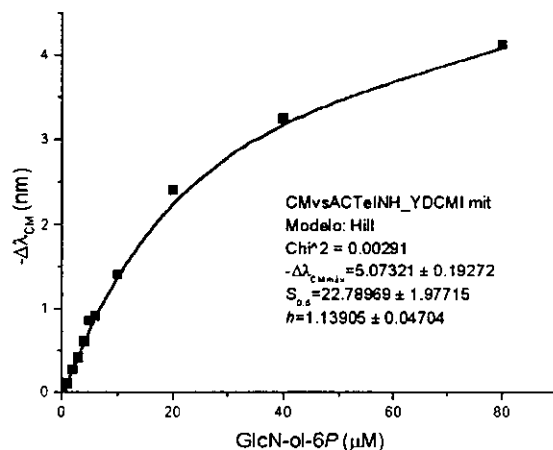
La fluorescencia del residuo Trp224 es muy similar a aquella vista para el residuo Trp15, a pesar de ser insensible a la unión del activador alostérico. En la Figura 9 se muestran los cambios de intensidad de fluorescencia y de centro de masa para la unión de GlcN-ol-6P a esta enzima. Es claro el comportamiento ligeramente cooperativo tanto del cambio de la intensidad de fluorescencia (Figura 9A) como del cambio de centro de masa (Figura 9B). Esta unión es, como en el caso de Trp15, una señal local o casi local. La ligera cooperatividad observada para esta enzima, y que no se presenta en la mutante Trp15, puede estar asociada a la menor cooperatividad cinética que presenta la mutante Trp224 ( $h = 2.4$ ). La menor cooperatividad que presentan las curvas de pegue directo (con inhibidor marcado con  $^3\text{H}$ ), o pegue visto a través del cambio de fluorescencia al unir GlcN-ol-6P, se explican por el hecho de que la desaminasa une las formas abiertas (no cíclicas) y cerradas (cíclicas) de la GlcN6P (Figura 1). El sustrato natural de esta enzima se encuentra mayoritariamente en su forma cerrada y es posteriormente abierto mediante un paso catalizado por el residuo His143 (Montero-Morán y col., 2001). La naturaleza abierta del inhibidor competitivo, GlcN-ol-6P, le permite unirse después del primer paso que cataliza esta enzima, lo cual podría disminuir la cooperatividad de su unión.



**Figura 9. Efecto de la unión de GlcN-ol-6P en A) el cambio de intensidad de fluorescencia y B) el cambio de longitud de onda del centro de masa en la mutante Trp224. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

### *Fluorescencia intrínseca de la GlcN6P desaminasa mutante Trp174.*

La mutante Trp174 no presenta cambios notorios en la intensidad de fluorescencia al ser titulada con GlcNAc6P. Sin embargo, la unión de GlcN-ol-6P a esta mutante presenta un perfil de tipo hiperbólico al ser analizado a través de  $-\Delta\lambda_{CM}$  (Figura 10) confirmando dos cosas: 1) la unión de este ligando al sitio activo produce un cambio no asociado a la transición cuaternaria y 2) el inhibidor competitivo produce, dado su corrimiento a longitudes de onda menores, un ambiente más hidrofóbico al Trp174. Esto último es coherente con la idea de que el ligando del sitio activo debe fijar la tapa del sitio activo en una conformación preferentemente cerrada. Cabe resaltar que al tener la sonda fluorescente en la tapa del sitio activo, la señal de respuesta se amplificó considerablemente, pasando de uno (para las mutantes Trp15 y Trp224) a cinco nm en el cambio de longitud de onda del desplazamiento del centro de masa.

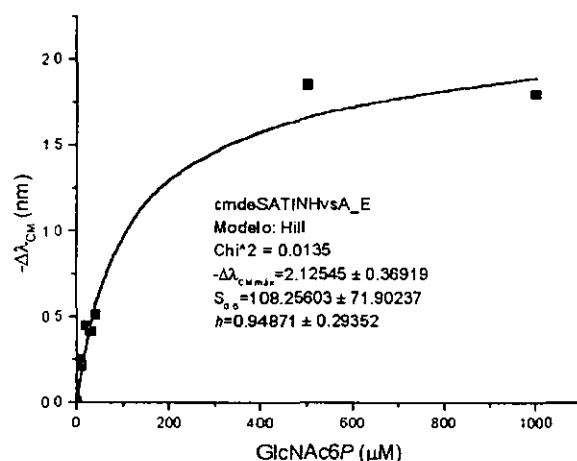


**Figura 10. Cambio negativo del centro de masa en función de la concentración de GlcN-ol-6P en la mutante Trp174. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

Posteriormente, la mutante Trp174 se saturó con 100  $\mu\text{M}$  de inhibidor competitivo a fin de tener el sitio activo ocupado y producir la transición T-R con el sitio alostérico vacío. Se tituló entonces con activador alostérico encontrando un comportamiento hiperbólico para el  $-\Delta\lambda_{CM}$  (Figura 11). Esto tiene diversas implicaciones: 1) se trata de un reajuste estructural de carácter local, 2) el desplazamiento del centro de masa hacia longitudes de onda menores implica la generación de un ambiente más hidrofóbico para el residuo Trp174 y 3) confirma que la unión de los dos ligandos modifica el microambiente electrónico de Trp174 y, en consecuencia, afecta la tapa

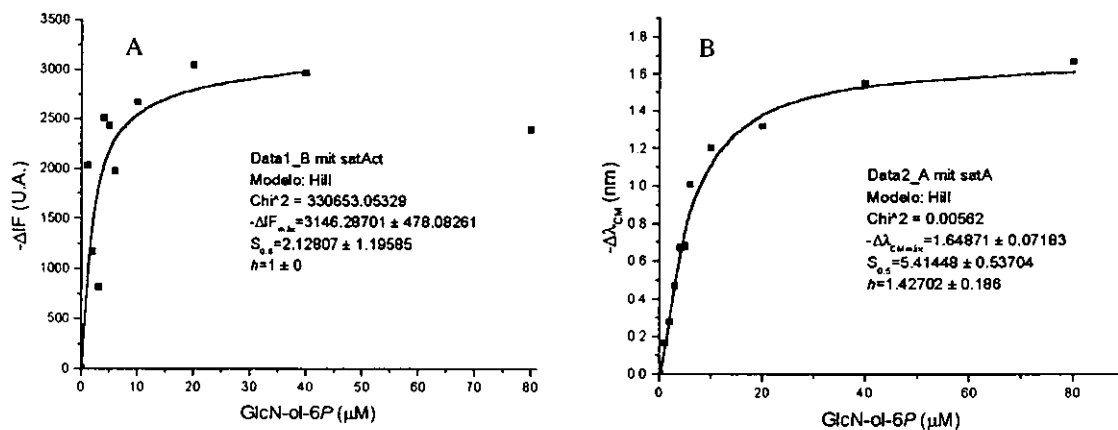
del sitio activo, más que el activador alostérico solo. Es interesante notar que el cambio de longitud de onda de centro de masa es sólo de 2 nm, pero debemos considerar que ya hubo un desplazamiento de 5 nm causado por la unión del inhibidor competitivo solo.

Al hacer el experimento contrario, es decir, saturando de activador y agregando distintas concentraciones de GlcN-ol-6P se obtuvieron los comportamientos observados en la Figura 12. El cambio de intensidad de fluorescencia es muy pequeño (los cambios observados en otros casos son del orden de 15000 a 70000 cpm mientras que para este caso son de solamente 3000 cpm) y por ello su certidumbre es pobre. Sin embargo, el centro de masa cambió en 1.6 nm, demostrando nuevamente que el estado de flexibilidad o movimiento de la tapa es distinto si se tiene el sitio activo lleno y el alostérico vacío ( $R_S$ ) y viceversa ( $R_A$ ). Más aún, ambos estados son distintos del estado en que se encuentran ambos sitios ocupados ( $R_{SA}$ ).



**Figura 11. Efecto de la adición de GlcNAc6P sobre el cambio negativo del centro de masa para la mutante Trp174 a concentración saturante de GlcN-ol-6P. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**





**Figura 12. Efecto de la adición de GlcN-ol-6P sobre A) el cambio negativo de intensidad de fluorescencia y B) el cambio negativo de longitud de onda del centro de masa para la mutante Trp174 a concentración saturante de GlcNAc6P. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

El efecto de concentraciones sobresaturantes de GlcNAc6P en las enzimas silvestre y Trp15 sobre la fluorescencia intrínseca de tales enzimas pone de manifiesto que el estado R producido a través de unión del activador alostérico ( $R_A$ ) es distinto del estado  $R_{AS}$ . También quedó claro que la adición de inhibidor competitivo a la enzima en estado  $R_A$  produce un cambio en su fluorescencia por lo que podemos afirmar que  $R_A$ ,  $R_S$  y  $R_{AS}$  son tres estados distintos, al menos vibracionalmente, es decir, pertenecen cada uno a un grupo específico de conformeros con muchas similitudes pero ligeramente distintos. Falta discutir la existencia de un cuarto estado que el modelo de Monod-Wayman-Changeux (1965) (y el sentido común) predice,  $R_0$ , es decir, el estado R sin ligando alguno que se encuentra en equilibrio con la forma  $T_0$ . Podemos postular la existencia de tal estado, lo que no significa que en realidad existe. De existir, su abundancia sería mínima comparada con el estado  $T_0$  ( $L = [T_0]/[R_0] \approx 10^6$ ), razón por la cual no podemos hablar mucho de él ya que por el momento no tenemos manera alguna de estudiarlo.

## Conclusiones

Se ha discutido ampliamente sobre los alcances de la cristalografía y su correlación con técnicas cuyo enfoque parte de moléculas en disolución. Ha quedado demostrado que el comportamiento de las biomoléculas en disolución dista mucho de aquel que se muestra en el estado cristalino aunque éste puede darnos mucha información de carácter estructural. Las proteínas poseen una naturaleza flexible (Freire, 2000) y sus posibles estados conformacionales son muchos aún sin sufrir cambios que la hagan perder su identidad funcional (desnaturalización). Lo que podemos medir a través de nuestras técnicas fisicoquímicas son promedios que asignamos a un estado conformacional, que en realidad es una familia de conformaciones cuyas diferencias están fuera de la sensibilidad de nuestros métodos. En el caso de la GlcN6P desaminasa, la tapa del sitio activo ha demostrado ser un claro ejemplo de esto. Es evidente que existe una conexión funcional entre la unión de ligandos y la movilidad de la tapa. Esta movilidad está desacoplada de la transición alostérica, ya que tanto el estado R como el estado T deben tener la capacidad de unir y liberar ligandos durante la catálisis. Aparentemente, la unión del activador alostérico, además de producir la transición cuaternaria, reduce las posibles conformaciones de la tapa facilitando la catálisis. En presencia de altas concentraciones de sustrato, el propio sustrato produce la transición alostérica y, a través del contacto directo, reduce los posibles estados conformacionales de la tapa del sitio activo.

## CONCLUSIONES GENERALES

Hemos estudiado la naturaleza de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa y encontramos una importante contribución de la componente entrópica en el cambio de energía libre asociado a dicha transición. También se encontró que la unión del sustrato en esta enzima está dirigido entrópicamente. Todo esto puso de manifiesto la posibilidad de que existan cambios de flexibilidad que sean los responsables de la transición alostérica y el comportamiento cinético de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

Se estudió la flexibilidad de la tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa encontrando que su movilidad es crítica para la actividad catalítica de la enzima. También quedó demostrado que existe una comunicación entre ambos sitios a través del motivo estructural beta-hélice-asa-beta que forma la tapa del sitio activo. El estudio de la mutante Phe174-Ala nos dio indicios de que existen componentes de cambio de movilidad que regulan el comportamiento cinético de esta enzima.

El estudio de la fluorescencia de triptofanos en la Glc6P desaminasa, en su estado actual, revela que existen varios estados vibracionales de la tapa del sitio activo y que se propagan por toda la molécula. Esto nos permite postular la existencia de varios estados alostéricos R ( $R_0$ ,  $R_S$ ,  $R_A$  y  $R_{AS}$ ), estructuralmente muy similares pero vibracionalmente distintos. Este estudio demuestra también que la movilidad de la tapa del sitio activo es independiente de la transición alostérica de la enzima. Este hecho es por sí mismo muy interesante y nos muestra que hay regiones en las proteínas que deben mantener una independencia estructural, o al menos en su movilidad, del resto de la molécula, aún cuando ésta cambie estructuralmente como en el caso de las transiciones cuaternarias.

## PERSPECTIVAS

La estabilidad conformacional de la tapa del sitio activo afecta la estructura del resto de la molécula como lo demuestra el presente estudio. Este comportamiento puede afectar la estabilidad térmica de la proteína en la enzima silvestre debido a modificaciones locales de estructura o a cambios de flexibilidad conformacional en sitios críticos de tensión. La mutante Phe174-Ala, descrita en este trabajo, tiene la tapa del sitio activo alterada en su estabilidad conformacional. Esta mutante parece poseer una tapa muy móvil en ausencia de activador alostérico mientras que se vuelve más rígida cuando se encuentra saturada del mismo. Aparentemente, la tapa del sitio activo es sumamente móvil pero no afecta la estructura del resto de la molécula. Es posible que incluso la estabilidad térmica de la proteína se vea afectada por las fluctuaciones estructurales de la tapa del sitio activo. La diferencia de estabilidad térmica entre las enzimas silvestre y mutante nos puede dar una idea de la importancia de la transferencia de la vibración producida por las posibles conformaciones de la tapa hacia el resto de la enzima. Un estudio calorimétrico de las enzimas mutante y silvestre podría responder a ésta incógnita a través de cambios significativos en la  $T_m$  o en parámetros como la entalpía de desnaturalización seguidos por actividad residual y por cambio de fluorescencia de triptofanos.

El estudio termodinámico de la transición alostérica presentado en este trabajo predice que la transición alostérica puede ser iniciada desde el sitio activo sólo cuando se ocupan tres sitios activos en el hexámero. Esto se puede interpretar en términos de interacciones moleculares entre el sustrato (S) y los dos cónformeros alostéricos (T y R). Implica que las interacciones  $T_6S_3$  son igualmente favorables que las  $R_6S_3$ , lo cual hace que sus poblaciones sean equimolares y en consecuencia el valor de  $L_3$  tienda a uno. Un reto interesante es la demostración experimental de este comportamiento. Abordando el problema con curvas de unión de ligandos y señales de cambio cuaternario no obtenemos información precisa de la naturaleza de dicho comportamiento, dado que nuestras técnicas nos dan promedios de poblaciones y no podemos distinguir entre dos moléculas con tres sitios llenos y dos moléculas, una con seis sitios llenos y otra completamente vacía. Parece entonces que debemos enfrentar el problema con nuevas metodologías, como la construcción de mutantes incapaces de

unir ligandos al sitio activo y mezclar, estequiométricamente, monómeros de éstas con monómeros de enzima silvestre, generando quimeras cuaternarias. Esto nos permitiría confirmar, por técnicas espectrométricas, el cambio cuaternario en función de la relación enzima silvestre a enzima mutante. Obviamente esto no puede ser tan fácil. Contamos con la tecnología para hacer mutantes y para mezclar sus monómeros con los de la enzima silvestre. Determinar la estequiometría se podría lograr con curvas de pegue con inhibidor competitivo radiactivo. Sin embargo la purificación de las diferentes especies presentaría un problema a resolver dada la casi nula diferencia entre ellas. La modificación química de residuos de cisteína o la introducción de grupos cargados en las moléculas mutantes podría facilitar esta tarea.

Durante la realización de este trabajo se generaron mutantes que pueden ser de gran interés desde puntos de vista alejados del objetivo original. La mutante Trp174 demostró que un grupo hidrofóbico en esa posición puede ser un buen modelo experimental. La utilización de este conocimiento para la introducción de sondas fluorescentes de vida media mayor que la del triptofano, podría dar, a través de su anisotropía de fluorescencia, indicios de su movilidad en términos geométricos. Por otro lado, estudios de cinética rápida en la mutante Trp174, o en una mutante con un residuo de cisteína en la posición 174 y marcada con una sonda fluorescente, nos podrá dar información sobre la existencia de intermediarios estructurales en el proceso de apertura y cerrado de la tapa del sitio activo.

Una mutante complementaria al estudio de fluorescencia de Trp que se encuentra en preparación es la que tiene un sólo residuo de Trp en la posición 254. Esta posición ha sido descrita como crítica en la transición cuaternaria de esta enzima (Montero-Morán y col, 1998). La mutante ya está hecha (una mutante triple con un sólo residuo de Trp en 254) y sólo falta el análisis de fluorescencia en función de la concentración de GlcN-ol-6P y GlcNAc6P. Si esta enzima, como lo suponemos, nos da señales cuaternarias puras, sería un excelente modelo no sólo para redondear los últimos resultados para publicar un tercer artículo sobre el tema de esta tesis, sino también para estudiar la dinámica de la transición alostérica a través de cinética rápida, la existencia de intermediarios y la velocidad del o los procesos de dicho cambio cuaternario.

## REFERENCIAS

- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 266-272.
- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Horjales, E. y Calcagno, M.L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* **34**, 6074-6082.
- Arreola, R. (1996). Estudios estructurales sobre la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* y otras especies. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bustos-Jaimes, I. y Calcagno M.L. (2001). Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**, 156-160.
- Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.
- Comb D.G. y Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* **232**, 807-827.
- Ferreira, S. (1989). Fluorescence studies of the conformational dynamics of parvalbumin in solution: lifetime and rotational motions of the single tryptophan residue. *Biochemistry* **28**, 10066-10072.
- Freire, E. (2000). Can allosteric regulation be predicted from structure? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11680-11682.
- Golinelli-Pimpaneau, B., Le Goffic, F. y Badet, B. (1989). Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*: mechanism of the reaction at the fructose 6-phosphate binding site. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3029-3034.
- Hilser, V.J., Dowdy, D., Oas, T.G. y Freire, E. (1998). The structural distribution of cooperative interactions in proteins: analysis of the native state ensemble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9903-9908.
- Huang, Y.T., Liaw, Y.C., Gorbatyuk, V.Y. y Huang, T.H. (2001). Backbone dynamics of *Escherichia coli* thioesterase/protease I: evidence of a flexible active-site environment for a serine protease. *J. Mol. Biol.* **307**, 1075-1090.
- Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C.A., Altamirano, M.M. y Calcagno, M.L. (1992). Purification and characterization of glucosamine-6-phosphate deaminase from dog kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 213-220.

- Lara-Lemus, R. y Calcagno M. L. (1998). Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type. *Biochim. Biophys. Acta* **1388**, 1-9.
- Leloir L.F. y Cardini, C.E., (1956). Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 33-42.
- Midelfort, C. y Rose I.A. (1977). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* **16**, 1590-1596.
- Monod, J., Wyman J. y Changeux, J.P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **2**, 88-118.
- Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. y Altamirano, M.M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **37**, 7844-7849.
- Montero-Morán, G.M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L.I., Plumbridge, J.A. y Calcagno, M.L. (2001). On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **40**, 10187-10196.
- Murzin, A.G., Brenner S.E., Hubbard T. y Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
- Natarajan, K., y Datta A. (1993). Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9206-9214.
- Nelson, S.W., Iancu, C.V., Choe, J.Y., Honzatko, R.B. y Fromm, H.J. (2000). Tryptophan fluorescence reveals the conformational state of a dynamic loop in recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* **39**, 11100-11106.
- Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. y Horjales, E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* **3**, 1323-1332.
- Osborne, M.J., Schnell, J., Benkovic, S.J., Dyson, H.J. y Wright, P.E. (2001). Backbone dynamics in dihydrofolate reductase complexes: role of loop flexibility in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **40**, 9846-9859.
- Parrington, J. Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., Lai, F.A.(1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* **379**, 364-368.
- Plumbridge, J.A. (1989). Sequence of the *nagBACD* operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the *nag* regulon. *Mol. Microbiol.* **3**, 506-515.

Plumbridge, J.A., Cochet, O., Souza, J.M., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L. y Badet, B. (1993). Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacterol.* **175**, 4951-4956.

Reizer, J., Ramseier, T.M., Reizer, A., Charbit, A. y Saier, M.H. Jr. (1996). Novel phosphotransferase genes revealed by bacterial genome sequencing: a gene cluster encoding a putative N-acetylgalactosamine metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**, 231-250.

Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J. y Söll, D. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* *nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* **62**, 197-207.

Rose, I.A. (1975). Mechanism of the aldose-ketose isomerase reactions. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **43**, 491-517 .

Sigrell, J.A., Cameron, A.D. y Mowbray, S.L. (1999). Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J. Mol. Biol.* **290**, 1009-1018.

Steimle, P.A., Lindmark, D.G., y Jarroll, E.L. (1997). Purification and characterization of encystment-induced glucosamine 6-phosphate isomerase in *Giardia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **84**, 149-153.